

**Molekulare Strukturveränderungen
der Lactatdehydrogenase durch Einwirkung
von OH - Radikalen**

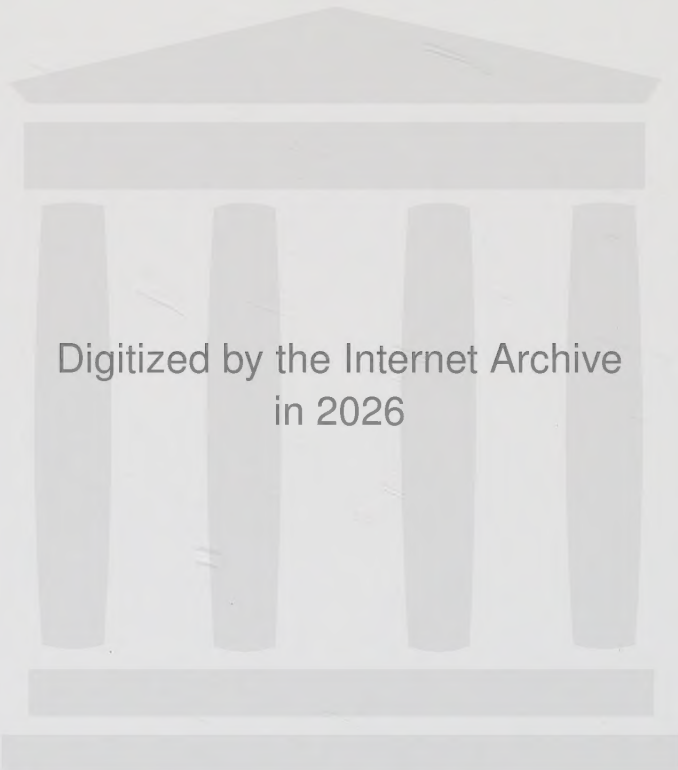
von

Renate Proksch

aus

Würzburg

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Molekulare Strukturveränderungen der Lactatdehydrogenase durch Einwirkung von OH - Radikalen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Medizin

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Renate Proksch

aus

Würzburg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Priv.-Doz. Dr. H. Schüssler
Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.1979

INHALTSÜBERSICHT

1. Einleitung und Problemstellung

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Materialien

2.1.2. Geräte

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereiten des Enzympräparates für die Bestrahlung

2.2.1.1. Allgemeines

2.2.1.2. Entsalzen der Enzymkristallsus- pension

2.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes

2.2.2.1. Bestimmung nach Biuret und Folin- Test

2.2.3. Bestrahlung

2.2.3.1. Bestrahlungsbedingungen

2.2.3.2. Dosisleistung

2.2.4. Messung der enzymatischen Aktivität

2.2.4.1. Prinzip

2.2.4.2. Durchführung

2.2.4.3. Auswertung

2.2.5. Gelchromatographie

2.2.5.1. Aufbau der Versuchsanordnung

2.2.5.2. Vorbereitung des Gels

2.2.5.3. Herstellen der Säulenpackung

2.2.5.4. Auftrennung der Enzymlösung

2.2.5.4.1. Prinzip

2.2.5.4.2. Betrieb der Chromatographiesäulen

2.2.5.4.3. Vorbereitung der Probe

2.2.5.4.4. Auswertung der Trennversuche

2.2.5.5. Bestimmung des Ausschlußvolumens

3. Ergebnisse

3.1. Verlust der enzymatischen Aktivität

3.1.1. Eichkurve für natives Enzym

3.1.2. Dosiseffektkurve

3.2. Pufferwahl

3.3. LKB-Chromatographie

3.4. Konzentrierung der Probe

3.5. Pufferwechsel

3.6. Gelchromatographie

3.6.1. Auftrennung in Gegenwart von SDS

3.6.2. Gelfiltration mit SDS nach Reduktion

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung

Nachdem Röntgen (1895) und Becquerel (1896) die ionisierende Strahlung und deren biologische Wirksamkeit entdeckt hatten, erfolgte bereits 1899, allerdings noch ohne genauere Kenntnis über die Wirkungsweise, die erste Anwendung dieser Strahlen bei der Therapie des Hautkarzinoms. Da man jedoch schon kurze Zeit später (1902) auch die cancerogene, also gegenteilige Wirkung derartiger Strahlen nachweisen konnte, machte es sich die Strahlenbiologie seither zur Aufgabe, alle Vorgänge zu erforschen, die während und nach Bestrahlung eines Organismus ablaufen. Weil aber bereits eine einzelne Zelle ein sehr kompliziertes Gebilde mit vielfachen Regelmechanismen darstellt, mußte man sich einfacherer Systeme bedienen, um derartige strahlenbedingte Prozesse zu analysieren. Solche Überlegungen führten dazu, bestimmte Zellinhaltsstoffe oder Bestandteile von Körperflüssigkeiten zu isolieren und sowohl als Trockensubstanz als auch in wässriger Lösung einer Bestrahlung auszusetzen. Man hoffte, die so gewonnenen Ergebnisse dann auf komplexe Systeme übertragen zu können.

Als Untersuchungsmaterial für derartige Experimente fanden neben den Nucleinsäuren hauptsächlich Enzyme Verwendung, seit es um 1960 gelungen war Ribonuclease,

Chymotrypsin, Trypsin und Lactatdehydrogenase (LDH) zu isolieren und hochgereinigt darzustellen. Darüber hinaus ist einerseits die chemische Struktur der eben genannten Enzyme bekannt (mit Ausnahme derjenigen der LDH), andererseits kann eine strahleninduzierte Veränderung ihrer biologischen Funktionen sehr empfindlich gemessen werden.

Auch die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Einwirkung ionisierender Strahlen auf ein Enzym, der Lactatdehydrogenase (LDH) aus Kaninchenmuskel.

LDH, ein Enzym der Glykolyse, katalysiert reversibel als Oxidoreduktase die Umwandlung von Pyruvat in Lactat. Die Quartärstruktur ist gegeben durch Zusammensetzung aus 4 Untereinheiten (Monomere). Da es 2 verschiedene Typen von Untereinheiten gibt (Typ Herzmuskel und Typ Muskel) ist die Bildung 5 verschiedener Isoenzyme möglich (1).

<u>Isoenzymentyp</u>	<u>Quartärstruktur</u>
LDH ₁	H ₄
LDH ₂	H ₃ M
LDH ₃	H ₂ M ₂
LDH ₄	HM ₃
LDH ₅	M ₄

Diese Isoenzymentypen sind wesentlich für die klinische Bedeutung der LDH.

Ganz allgemein findet sich eine Erhöhung der LDH-Aktivität im Serum bei zahlreichen Erkrankungen und Funktionsstörungen. Unter Berücksichtigung des jeweils organcharakteristischen Isoenzymprofils lassen sich aus dem Ausmaß der LDH-Aktivitätssteigerung Rückschlüsse auf das befallene Gewebe bzw. erkrankte Organ ziehen.

Das Molekulargewicht aller Tetrameren des Enzyms beträgt 142 000 (2), das der monomeren Untereinheit 36 000 (3).

Native LDH besitzt keine Disulfidbrücken, sondern 22 SH-Gruppen; ihre Aminosäure-Sequenz ist nur teilweise bekannt (4).

Die Untereinheit besteht nach Röntgenstrukturanalysen aus 311 Aminosäuren und soll bis auf einen kurzen Rest am N-terminalen Ende globulärer Struktur sein (5).

Davon entfallen ungefähr 24 % auf α -Helices, 10 - 15 % auf β -Strukturen (5).

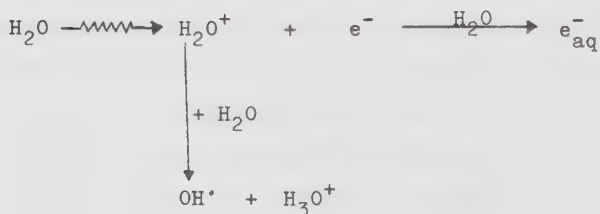
Wird das Enzym als Trockensubstanz bestrahlt, spricht man von "direkter Strahlenwirkung", da dann die Makromoleküle durch die in ihnen selbst absorbierte Strahlenenergie verändert werden. Erfolgt die Bestrahlung hingegen in wässriger Lösung, entsprechend der biologischen Situation, liegt eine "indirekte Strahlenwirkung" vor. Jetzt kommt nämlich nicht die von den Molekülen selbst, sondern die vom Lösungsmittel absorbierte Energie zur Wirkung. Die Strahlen greifen also das Substrat-

molekül nicht direkt an, sondern über den Umweg des H_2O -Moleküls, das seinerseits aktiviert wird und mit dem gelösten Proteinmolekül reagiert.

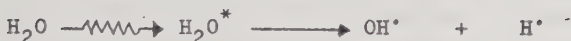
Aufschlüsse über die genaue Wirkungsweise dieser Vorgänge gaben erstmals Haber und Weis 1934, als sie freie OH-Radikale in wässriger Lösung nachweisen konnten(6). Den Beweis für das Vorhandensein hydratisierter Elektronen lieferten dann 1962 Hart und Boag (7), sowie 1963 Keene (8) durch Entdeckung des Absorptionsspektrums des hydratisierten Elektrons bei der Pulsradiolyse des Wassers.

Heute geht man davon aus, daß bei der Radiolyse von Wasser durch Ionisations- und Anregungsprozesse, entsprechend der im folgenden angeführten Gleichungen, OH- und H-Radikale sowie hydratisierte Elektronen entstehen, die dann mit dem gelösten Substrat reagieren.

Ionisation des Wassermoleküls:



Anregung und Dissoziation:



Mit strahleninduzierten Strukturveränderungen der LDH befaßten sich bereits mehrere Arbeiten.

Denkl und Kunigk (9, 10) fanden bei der Strahlendena-
turierung der LDH zum einen eine Molekülschädigung, ver-
bunden mit einem Aktivitätsverlust, zum anderen eine
mit der Dosis zunehmende Vergrößerung der Enzymmoleküle.
Diesen Effekt konnten auch Haskill und Hunt (11), Shapi-
ra (12) sowie Schüßler und Jung (13) bei bestrahlter
Ribonuclease nachweisen.

Niemczyk fand, daß das Aggregat, das beim Bestrahlen von
LDH unter N_2 entstanden war, aus Proteinbruchstücken be-
stand, die über hydrophobe Bindungen und elektrostati-
sche Wechselwirkungen miteinander verbunden sind (14).

In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, welche mole-
kularen Veränderungen an LDH nach Einwirkung von OH-Ra-
dikalen auftreten, insbesondere soll dabei festgestellt
werden, ob unter diesen Bedingungen Peptidbrüche oder
Bildung von Disulfidbrücken nachweisbar sind. Dazu sol-
len nach Einwirkung der OH-Radikale auf LDH die nicht
kovalenten Bindungen durch Natriumdodecylsulfat gelöst
und durch Gelchromatographie die Molekülgröße des be-

strahlten Enzyms festgestellt werden.

Durch Reduktion der bestrahlten LDH und anschließende Gelfiltration soll nachgewiesen werden, ob Disulfidgruppen gebildet worden sind.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Materialien

Folgende Materialien wurden verwendet:

- Laktatdehydrogenase¹⁾ aus Kaninchenmuskel in einer 3,2 M Ammoniumsulfatlösung
- reduziertes β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid²⁾
- Na-Pyruvat, kristallisiert; alle von Boehringer & Söhne, GmbH Mannheim
- Sephadex G-25, G-10 und G-200
- Blue Dextran 2000, beide von Pharmacia, Uppsala/Schweden
- Ultrogel AcA 34 (Polyacrylamid/Agarose); LKB Instrument GmbH
- Maranon
- Incidin; beide von Henkel GmbH, Düsseldorf
- Hibitane; Imperial Chemical Industries
- Natriumazid
- Dodecylhydrogensulfat als Natriumsalz³⁾
- Neßler's Reagenz, sowie alle übrigen Chemikalien von Merck, Darmstadt.

Es wurde nur entionisiertes, zweimal quarzdestilliertes Wasser verwendet.

Abkürzungen

1) LDH, 2) NADH, 3) SDS,

2.1.2. Geräte

Folgende Geräte wurden bei Versuchsdurchführung benutzt:

- Therapie-Röntgenröhre TR 300 f der Firma Siemens, Erlangen
- Spektralphotometer PMQ II von Carl Zeiss, Oberkochen
- Spektralphotometer Model 24, Beckmann
- Quarz-Infrasil- und Suprasilküvetten (QI und QS) von Hellma Müllheim
- Finnpipetten, Finnland
- pH-Meter 27 von Radiometer, Kopenhagen (Dänemark)
- Elektrisches Magnetrührgerät JKA-Combimag von Janke und Kunkel, Staufen
- Chromatographierohre aus Plexiglas
- Bestrahlungstopf aus Quarglas mit Plexiglasmantel, beides nach Plan angefertigt von Herrn Lehmeier, Institut für Radiologie, Universität Erlangen
- Ultro Rac-Fraktionssammler LKB 7000
- Uvicord Ultraviolett-Absorptiometer Detector Unit-Type 83003 A
- Uvicord Ultraviolett-Absorptiometer Control Unit-Type 8301 A, alle LKB-Producter, Bromma (Schweden)
- Colora Kühltruhe für Ultro-Rac 7000 von Colora Meßtechnik, Lorch (Württemberg)
- Optilab-Analog-Digital-Wandler Multilog 801,
- Optilab-Printer-Driver 833
- Optilab-Electronic-Timer 825; alle Optilab und Bo

Philip, Instrumentation AB Vällingby (Schweden)

-Calculator 9100 von Hewlett Packard, Loveland, Colorado (U.S.A.)

-Kältethermostat Ultra-Kryomat TK 30 D von Wobser, Lauda

-Tele-Thermometer YSI Model 42SC von Yellow Springs, Yellow Springs, Ohio (U.S.A.)

-Ultrazentrifuge UJ2 von Martin Christ, Osterode (Harz)

-Vapoklav Sterico AG, Dietikae 1

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereiten des Enzympräparates für die Bestrahlung

2.2.1.1. Allgemeines

Um eine Störung der Meßergebnisse, besonders bei den einzelnen Chromatographieläufen, durch Mikroorganismen zu vermeiden, wurden sämtliche Versuche unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt.

Alle Geräte (Schläuche, Filter, Pipetten, Bechergläser, Chromatographiesäulen usw.), die mit Enzym, Puffer oder Gel in Berührung kamen, wurden vor Gebrauch mit 70 %igem Propanol bzw. Maranon desinfiziert.

Die Chromatographiesäulen wurden vor der Füllung mit einem Laborreiniger (Edisonite) gesäubert, mit Aqua dest.

ausgewaschen, anschließend mit 5 %igem Maranon keimfrei gemacht und zuletzt mit sterilem Aqua dest. erneut ausgespült.

Puffer und Gel wurden (mit Ausnahme des LKB-Gels) vor Verwendung 20 Minuten bei 120°C autoklaviert.

Um das Wachstum eventuell vorhandener Bakterien und Pilze auf ein Mindestmaß herabzusetzen, was sich besonders während der heißen Sommermonate als sehr schwierig erwies, wurden alle Trennversuche über auf 4°C gekühlten Gelsäulen vorgenommen, die sich in einem zusätzlich gekühlten, mit UV-Licht ausgestrahlten Raum befanden.

Zur Kontrolle der Keimfreiheit dienten Proben auf Agarplatten, die nach Beimpfung 24 - 48 Stunden bei 37°C bebrütet wurden. Konnten Mikroorganismen nachgewiesen werden, wurde zur Bakteriostase 1 %iges Natriumazid und Hibitane (0,02 %ig) in die Säulenpackungen eingespült. Eine Schädigung des Gels wurde hierbei nicht beobachtet.

Vor jedem neuerlichen Versuch wurden Kühltruhe und Fraktionssammler mit Incidin gesäubert.

2.2.1.2. Entsalzen der Enzym-Kristallsuspension

Das Enzympräparat wurde als Kristallsuspension in einer 3,2 M Ammoniumsulfatlösung geliefert. Die Konzentration betrug nach Angaben des Herstellers 10 mg/ml.

Da das Enzympräparat infolge des hohen Salzgehaltes für die Bestrahlung nicht verwendet werden konnte, trennten wir das Ammoniumsulfat durch Gelfiltration über eine Säule (85 x 1,8 cm) von Sephadex G-25 fine ab.

Vor dem Auftragen der Probe, die zu gleichen Teilen aus Enzym und dem späteren Bestrahlungspuffer bestand, wurde das Gelbett mit ca. 300 ml desselben Puffers (0,1 M NaPO_4 , pH 7,0) äquilibriert; dieser Puffer diente anschließend auch als Elutionsmittel.

Das Eluat wurde unter Kühlung in Fraktionen zu je 3 ml, das entspricht 45 Tropfen, aufgefangen. Den Proteingehalt jeder Fraktion bestimmten wir photometrisch (siehe Abschnitt 2.2.2.) und wiesen das abgetrennte Ammoniumsulfat mit Neßler's Reagenz nach (auf 1 ml Eluat 0,5 ml Neßler's Reagenz). Die salzfreien Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden vereinigt und bis zur Bestrahlung bei 4°C verschlossen aufbewahrt.

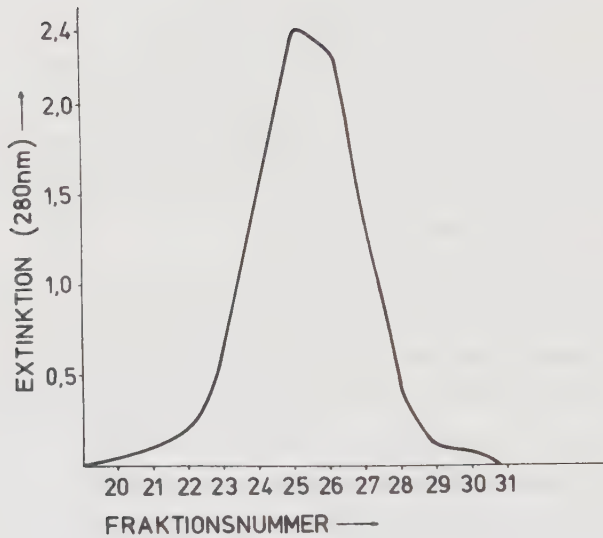


Abb.1:

Elutionsdiagramm von nativer LDH über G-25 fine (50 x 1,5 cm)
Nachweis des Ammoniumsulfats mit Neßler's Reagenz ab Frak-
tion 35.

2.2.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration des entsalzten Eluats bestimmten wir durch Messung der UV-Absorption.

Hierzu wurden zunächst alle Fraktionen einzeln in 1 cm Küvetten bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Spaltbreite von 0,05 mm gegen den Elutionspuffer gemessen. Anschließend vereinigten wir die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration und ermittelten wiederum die Extinktion. Der Berechnung des Proteingehaltes lag der Extinktionskoeffizient $E = 1,44 \frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}}$ einer 0,1 %igen LDH-Lösung bei 280 nm zugrunde. Dieser basiert auf der Bestimmung des Trockengewichtes von LDH bei 106°C (2). Gemäß der Beziehung $E_{280\text{nm}} \cdot 1,44^{-1} = C \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]$ konnte die jeweilige Probenkonzentration entweder mit Puffer oder mit Fraktionen niedrigeren Proteingehaltes so verdünnt werden, daß man die gewünschte Konzentration von 1 mg/ml erhielt.

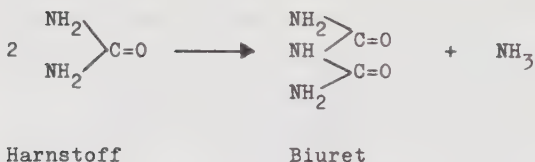
2.2.2.1. Bestimmung nach Biuret und Folin

Die im vorangegangenen beschriebene Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes, die vor allem den Anteil an aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan) mißt, zeigt keine sehr große Empfindlichkeit und nur eine mäßige Eiweißspezifität. Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit Peaks mit nur geringem Proteingehalt zu bestimmen

waren, wurden dazu zwei andere, empfindlichere Testverfahren angewandt, auf die hier kurz eingegangen werden soll:

a) Biuret - Methode

Stoffe mit mindestens zwei Peptidbindungen geben mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung eine Violettfärbung. Die einfachste Verbindung, die eine positive Reaktion gibt, ist das Biuret, das durch Erhitzen von Harnstoff hergestellt werden kann:



Die Biuret - Reaktion beruht auf einer Komplex - Bildung eines Kupfer-II-Ions mit 4 Peptid - N - Atomen unter alkalischen Bedingungen. Sie ist spezifisch für Peptide, Polypeptide und Proteine und gibt negative Resultate mit Ammoniak, Harnstoff, Aminosäuren und anderen einfachen N-haltigen Verbindungen. Mit Proteinen liegt das Extinktionsmaximum bei 546 nm, bei Peptiden ist es mehr gegen das kurzwellige Licht verschoben. Die Farbintensität ist

der Zahl der Bindungen über einen weiten Meßbereich direkt proportional.

Hergestellt wurde das Biuret - Reagenz nach einer Vorschrift von R. Richterich (55).

Zum Testansatz verwendeten wir 1,5 ml dieses Reagenzes und 1,5 ml einer Fraktion.

b) Folin - Methode

Dieser Methode liegt das Prinzip sowohl der Biuret- als auch der Tyrosin - Tryptophanbestimmung in einem zugrunde. Da sich in den zu untersuchenden Proben häufig auch Mercaptoäthanol befand, was den Proteinnachweis stört, wurde nach einer Vorschrift von P.J. Geiger und S. P. Bessman (56) vorgegangen, die die Störung des Nachweises durch Mercaptoäthanol mittels eines Zusatzes von H_2O_2 umgeht. Diese Vorschrift wurde entsprechend unseren Versuchsbedingungen abgeändert. Einer 1 %igen $CuSO_4$ -Lösung wurde im Verhältnis 1:1 5,4 %iges Na_2 -Tartrat zugesetzt; ein Teil dieser Lösung wurde mit 10 Teilen 10 %iger Na_2CO_3 -Lösung gemischt. Für den Ansatz mischten wir 1 ml dieser alkalischen Cu-Lösung mit 1 ml der Probe und gaben dann 0,2 ml 1,6 %ige H_2O_2 -Lösung hinzu. Anschließend wurde 10 Minuten lang bei $55^{\circ}C$ inkubiert und dem Ganzen 0,5 ml 1 N Folin-Reagenz hinzugefügt. Nach 1 Minute wurde die Extinktion bei 750 nm gegen einen Kontrollwert bestimmt.

Zu beachten ist dabei, daß der Extinktionswert sehr schnell absinkt, wenn das Folin-Reagenz zu der noch warmen Lösung gegeben wird; bereits nach 1 Minute liegen die Werte dann niedriger als bei Zugabe des Folin-Reagenzes zur abgekühlten Lösung. Andererseits tritt in bereits abgekühlten Proben, die Mercaptoäthanol und SDS enthalten, bei Zusatz des Folin-Reagenzes sehr leicht eine Trübung auf, die als Extinktion gemessen wird. Daher ist es vorteilhaft, nach dem Inkubieren zuerst die Proben zu messen, die Mercaptoäthanol und SDS enthalten und danach die proteinhaltigen Lösungen. Die Extinktionswerte wurden jeweils 1 Minute nach Zugabe des Folin-Reagenzes abgelesen.

2.2.3. Bestrahlung

2.2.3.1. Bestrahlungsbedingungen

Bestrahlt wurden 10 ml einer entsalzten LDH-Lösung von der Konzentration 1 mg/ml ($= 7,14 \cdot 10^{-6} \text{M}$).

Die Bestrahlung fand im wesentlichen unter den gleichen Bedingungen statt, wie sie in früheren Arbeiten zu finden sind. (Diss. von Denkl, Niemczyk und Kunigk). Die Proteinlösung befand sich dabei in einem Quarztöpfchen, das von einem Plexiglas-Kühlmantel umgeben, und mit Öffnungen sowohl für die Probenentnahme, als auch für die Zuleitung von N_2O versehen war. Zur Röhre hin wurde das Gefäß, das

auf einem Magnetrührgerät stand, von einer 0,03 mm dicken Hostaphanfolie abgeschlossen. Ein 5 cm dicker Plexiglasblock zwischen dem Magnetrührgerät und dem Quarztöpfchen verhinderte, zusammen mit dem Kühlmantel, eine Rückstreuung der Röntgenstrahlen von den Metallteilen des Rührers. Der Durchmesser des Gefäßes war so bemessen, daß bei einem Probenvolumen von 10 ml die zu bestrahlende Schichtdicke 1 cm betrug (siehe Abb. 2).

1 1/2 Stunden vor und während der gesamten Bestrahlung leiteten wir N_2O über die Enzymlösung, die bei $2^{\circ}C$ ständig durch ein Magnetrührstäbchen langsam umgewälzt wurde. Damit war eine gleichmäßige Gasverteilung in der Probe gewährleistet; die Gaskonzentration betrug dabei 0,05 Mol/l (15). Bevor das N_2O jedoch die Probe erreichte, wurde es zwecks Entfernung des Sauerstoffs durch eine Pyrogallol-Lösung geleitet. Der O_2 -Gehalt der bestrahlten Lösung lag bei Verwendung von N_2O unter $3,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Zur Erstellung einer Dosiseffektkurve entnahmen wir, der jeweiligen Versuchsdauer entsprechend, alle 3 - 5 Minuten eine Probe von 150 - 200 μl .

2.2.3.2. Dosisleistung

Zur Bestrahlung wurde eine Röntgenröhre Stabilipan 300 der Firma Siemens verwendet.

Die Röhrenspannung betrug 200 kV bei 20 mA Röhrenstrom.

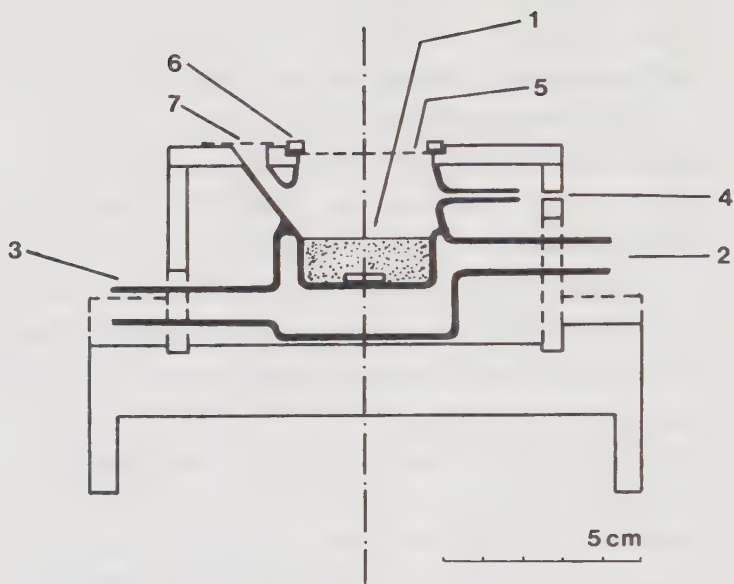


Abb. 2:

Darstellung des Bestrahlungsgefäßes im Schnitt. Auf der median eingezeichneten Achse des Strahlenganges ist der effektive Fokus markiert. Es bedeuten:

- 1 Quarztöpfchen mit Probe und teflonbeschichtetem Magnet-
rührstäbchen
- 2 Kühlmittelzufluß
- 3 Kühlmittelabfluß
- 4 Gaszuleitung
- 5 Hostaphanfolie
- 6 Klemmring
- 7 Stützen für Probenentnahme und Gasauslaß

Es wurde kein Filter benutzt. Die Eigenfilterung der Röhre entsprach 2 mm Aluminium.

Die Messung der Dosisleistung, die dankenswerterweise bereits vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt worden war, ergab einen Wert von 2,75 krd/Min. Detaillierte Angaben zur Dosismessung finden sich in den Arbeiten von Kunigk und Zahn.

2.2.4. Messung der enzymatischen Aktivität

Infolge des stöchiometrischen Reaktionsablaufes wird pro Mol Pyruvat 1 Mol NADH zu NAD^+ dehydriert. Die Extinktion des Dihydropyridinsystems sinkt dabei proportional zur Abnahme von NADH. Bei geeigneter Enzymverdünnung verläuft die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit linear und ist ein direktes Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit.

2.2.4.2. Durchführung

Der Testansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

3,00 ml 0,1 M NaH_2PO_4 -Puffer pH 7,0

0,05 ml NADH_2 (7,1 mg/ml in 1 %igem NaHCO_3)

0,025 ml Enzymlösung

0,05 ml Pyruvat (8,6 mg/ml in H_2O)

Die Pyruvat- und NADH_2 -Lösungen wurden höchstens 1 Tag vor Gebrauch angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Die Reaktion wurde mit Pyruvat gestartet und verlief bei Zimmertemperatur. Auf das Mitführen eines Leerwertes verzichteten wir, da die Reaktion ohne LDH unter den gegebenen Bedingungen praktisch nicht abläuft (9).

Die Extinktionsabnahme wurde über 30 sec verfolgt und dabei alle 3 sec vom Optilab-Gerät registriert.

2.2.4.3. Auswertung

Die gemessenen Extinktions-werte wurden graphisch gegen

die Meßzeit aufgetragen, was im Idealfall eine Gerade durch alle Punkte ergab.

Aus dieser Darstellung konnten wir ersehen, an welcher Stelle die Zeit-Umsatz-Kurve eventuell abflachte, d.h. die ermittelten Punkte stark von dem zu Beginn linearen zeitlichen Abfall der Extinktion abwichen. Für die weitere Berechnung der Enzymaktivität blieb dieser Teil der Kurve unberücksichtigt, da andernfalls die Korrelation empfindlich beeinträchtigt worden wäre.

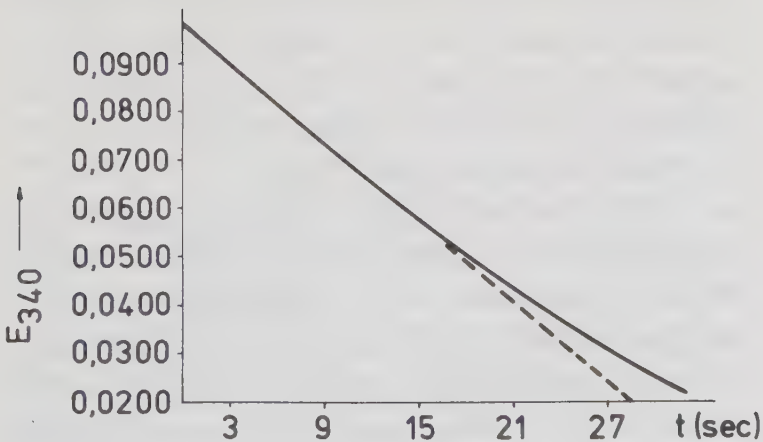


Abb. 3:

Zeit-Umsatzkurve einer bestrahlten LDH-Lösung der
Konzentration 22,7 $\mu\text{g/ml}$

Da die Enzyminaktivierungsrate exponentiell von der Bestrahlungszeit bzw. der Dosis abhängt (18, 19), läßt sich die Restaktivität nach folgender Gleichung ermitteln:

$$A = A_0 \cdot e^{-bt} \longrightarrow \ln A = -bt + \ln A_0$$

Hierbei ist

A die gesuchte Aktivität

A_0 die Aktivität vor der Bestrahlung

t die Bestrahlungsdauer

Für A wurden die für $\Delta E/\text{sec}$ gemessenen Werte in obige Gleichung eingesetzt und b, A_0 sowie die Korrelation R mit Hilfe eines Tischrechners bestimmt. Die von der Dosis abhängige Restaktivität erhält man, wenn man $A_0 = 100 \%$ setzt und $\Delta E/\text{sec}$ darauf bezieht.

Die Division von $\ln 2$ durch die Steigung b ergibt die Bestrahlungszeit in Minuten, nach der noch eine Aktivität von 50 % vorhanden ist. Wird diese mit der Dosisleistung (krd/Min.) multipliziert, so erhält man die D_{50} . Die D_{37} (Restaktivität von 37 %) läßt sich aus der Division der Dosisleistung durch die Steigung b ermitteln.

2.2.5. Gelchromatographie

2.2.5.1. Aufbau der Versuchsanordnung

Um die einzelnen Trennschritte am bestrahlten Enzym durchführen zu können, benötigten wir 3, zeitweise 4 Säulen verschiedener Füllung:

1. Sephadex G-75, zum Pufferwechsel der bestrahlten Lösung

2. LKB-AcA 34, zur Abtrennung möglicherweise entstandenen Aggregats.

Dieses Gel erwies sich jedoch im Verlauf der Arbeit als untauglich, da es nicht zu sterilisieren war und so eine Kontamination mit Mikroorganismen nicht verhindert werden konnte. Darüber hinaus waren die Keime gegenüber herkömmlichen Bakteriostatica resistent und konnten nur nach Erstellung eines Antibiotogramms mit hochspezifischen Antibiotica wie Rifampicin oder Chloramphenicol abgetötet werden. Außerdem durfte man bei diesem Gel kein SDS mitverwenden. Diese Behinderungen führten dazu, daß wir dieses Gel nur zu Beginn dieser Arbeit benutzten.

3. Sephadex G-10, zur Trennung eventuell entstandener niedermolekularer Bruchstücke

4. Sephadex S-200, ebenfalls zur Trennung von möglicherweise gespaltenen Untereinheiten.

Als Gelbett diente ein Plexiglasrohr. Dieses war konzentrisch von einem weiteren Rohr umgeben, das den Kühlmantel bildete. Die Säulen wurden mit Hartplastikstempeln luftdicht abgeschlossen. Polyacrylamidsiebe, Perlonfilter und Glasfasermatten am Ein- und Auslauf verhinderten das Eindringen von Gelpartikeln in die Teflonschläuche. Genaue Angaben über den Bau von Chromatographiesäulen enthält die Dissertation von Kunigk (10).

2.2.5.2. Vorbereitung des Gels

Das trockene Gel wurde pro g in 3 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt. Man ließ das Gel sedimentieren und nach 15 Minuten wurde der Überstand mit den noch nicht abgesetzten Gelpartikeln mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Volumen mit Aqua dest. ergänzt; diesen Vorgang wiederholten wir mehrmals. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten bei 120° C sterilisiert. Durch die hohe Temperatur und die Zeit bis zur Füllung der Säule (mindestens 1 Tag) war eine vollständige Quellung des Gels gewährleistet.

2.2.5.3. Herstellung der Säulenpackung

Nach Desinfektion der Säule (siehe Abschnitt 2.2.1.1.) wurde das sterile, entgaste Gel bei zunächst geschlossenem Auslauf eingegossen. Das Einfüllen der Gelsuspen-

sion geschah mit Hilfe eines Glasstabes, um eventuelle Blasenbildung im Gelbett zu verhindern. Als Pufferreservoir benutzten wir einen Glastrichter. Der Pufferdurchfluß erfolgte, im Gegensatz zu früheren Arbeiten, immer von oben nach unten, wobei der Druck je nach Art des Gels nie mehr als 15 - 20 cm H₂O betrug. Auf diese Weise erzielten wir eine gleichmäßige Gelpackung mit hoher Durchflußrate. Bevor die Säule jedoch betriebsbereit war, mußte sie mit einer ausreichenden Menge des Elutionspuffers äquilibriert werden.

2.2.5.4. Auftrennung der Enzymlösung

2.2.5.4.1. Prinzip

Die bestrahlten Enzymproben wurden über LKB-AcA 34, Sephadex G-75, Sephadex G-10 und Sephadex S-200 chromatographiert. Sephadex, ein modifiziertes Dextran mit hydrophilem Charakter, stellt ein dreidimensionales Gebilde aus Polysaccharidketten dar. LKB-Gel ist dagegen ein Polyacrylamid-Agarose-Gemisch.

Das Prinzip der Gelchromatographie besteht darin, Molekülgemische hinsichtlich ihrer Größe, d.h. bei ähnlicher Konformation entsprechend ihrem Molekulargewicht zu trennen. Dabei bilden die Hohlräume der granulierten, gequollenen Gelkörnchen die stationäre, der Elutionspuffer die mobile Phase des Systems. Solche Moleküle, die die

Poren des Gels an Größe übertreffen, die also oberhalb der Trenngrenze liegen, dringen nicht in die Gelperlen ein, sondern wandern in der Lösungsphase durch die Säule. Kleinere Moleküle hingegen durchsetzen die Gelpartikel je nach Form und Größe und erscheinen dementsprechend verzögert im Eluat. Sie verlassen in Reihenfolge abnehmender Molekülgröße die Säule.

2.2.5.4.2. Betrieb der Chromatographiesäulen

Vor jedem Trennungsgang wurde das Gelbett in ausreichendem Maße mit dem entsprechenden Elutionspuffer vorgespült.

Die bestrahlten Enzymproben wurden vor dem Auftragen auf Zimmertemperatur erwärmt. Dadurch konnte eine Gasbildung in den Schläuchen infolge Erwärmung der Lösung während des Auftragens vermieden werden. Der Elutionspuffer war der Temperatur des Chromatographieraums (ca. 23°C) ausgesetzt. Das hatte den Vorteil, daß sich weniger N₂ und O₂ löste als bei der Passage durch die gekühlte Säule.

Der ableitende Schlauch war an eine Pumpe angeschlossen, die einen stets gleichmäßigen Durchfluß von oben nach unten gewährleistete. Die Geschwindigkeit betrug dabei im Mittel 3 ml/10,5 Min.

Bei Zusatz von SDS zum Elutionspuffer verringerte sich die Oberflächenspannung eines Tropfens und damit sein Volumen. Deshalb mußten wir, um die gewählte Fraktionsgröße von 3 ml beibehalten zu können, die Tropfenzahl entsprechend erhöhen.

<u>Puffer</u>	<u>Tropfenzahl</u>
0,1 M Na-Phosphat	45
0,1 M Na-Phosphat, 3 mM SDS	84
0,01 M Na-Phosphat, 3 mM SDS	84
0,01 M Na-Phosphat, 2 mM SDS	78

2.2.5.4.3. Vorbereitung der Probe

Vor der Chromatographie mit SDS unterzogen wir einige Enzymproben der Reduktion. Dazu wurde das halbe Probenvolumen von 5 ml mit 50 μ l Mercaptoäthanol und der dem Versuch entsprechenden Menge SDS 2 Std. bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Reduktionsversuche ohne SDS und bei Zimmertemperatur hatten sich als problematisch erwiesen.

2.2.5.4.4. Auswertung der Trennversuche

Mit einem Uvicord-Monitor registrierten wir fortlaufend

die Transmission (280 nm) des Eluats. Je nach Konzentration der Enzymlösung wurde dabei mit oder ohne Skalenspreizung aufgezeichnet.

Das Eluat wurde in Portionen zu je 3 ml gesammelt und bis zum Versuchsende in der Kühltruhe belassen. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei 280 nm gegen den Elutionspuffer gemessen. Methodisch gingen wir dazu gemäß Abschnitt 2.2.2. vor.

2.2.5.5. Bestimmung des Ausschlußvolumens

Alle Moleküle, die sich aufgrund ihres Molekulargewichtes jenseits der oberen Trenngrenze des Gels befinden, werden im Ausschlußvolumen eluiert.

Dieses Ausschlußvolumen V_0 , d.h. die Summe der Lücken zwischen den einzelnen Gelperlen, wurde mit Blue-Dextran, einem synthetischen Polysaccharid mit einem mittleren Molekulargewicht von 2 000 000, bestimmt. Das erschien notwendig, um eine vielleicht aufgetretene positive oder negative Größenveränderung des Bestrahlungsproduktes beurteilen zu können.

3. Ergebnisse

3.1. Verlust der enzymatischen Aktivität

3.1.1. Eichkurve für natives Enzym

Die Aktivitätsmessung eines Enzyms (Beschreibung unter 2.2.4.) stellt ein geeignetes Maß zur Beurteilung seines biochemischen Verhaltens dar. Ergeben sich hierbei Abweichungen von der "Norm", lassen sich diese unter definierten und konstanten Reaktionsbedingungen auf Veränderungen am Molekül zurückführen. In unserem Fall handelt es sich dabei um die Erfassung einer strahleninduzierten Aktivitätsabnahme in Abhängigkeit von der Energiedosis.

Derartige Prozesse kann man bei einem Vergleich der Dosiseffektkurve (3.1.2.) mit der sogenannten Eichkurve, d. h. einer Kurve, die die Aktivität unter Standardbedingungen widerspiegelt, erkennen. Zur Erstellung der Eichkurve wurde 1 mg LDH ($\cong$ 0,1 ml Enzymlösung) in 10 ml Na-Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst.

Mit dieser LDH-Lösung setzten wir folgende Verdünnungsreihe an:

<u>LDH-Lösung</u>		<u>0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0</u>	
0,1 ml	auf	0,9 ml	→ 10 µg LDH/ml
	bis einschließlich		
0,9 ml	auf	0,1 ml	→ 90 µg LDH/ml

Die LDH-Menge der einzelnen Proben im Testansatz entspricht den in der Abbildung angegebenen Werten in Mikrogramm.

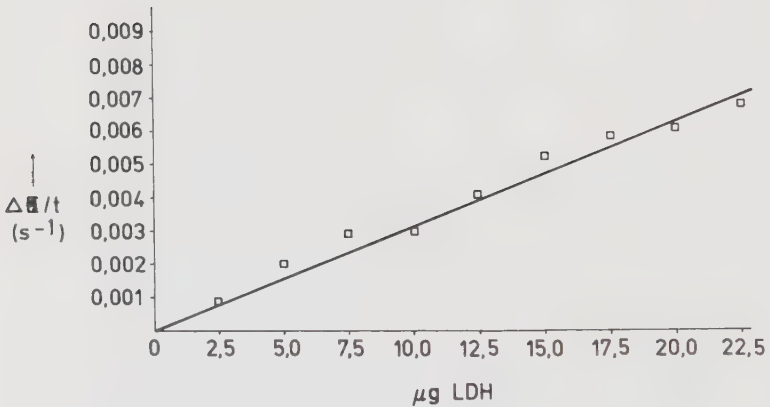


Abb. 4:

Eichkurve für die Aktivität nativer LDH

Dieser Eichkurve liegt die Beziehung $y = mx + b$ zugrunde. Daraus ergab sich eine Steigung m von $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1} / \mu\text{g}^{-1}$ sowie ein Achsenabschnitt b von $2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; Die Korrelation r betrug dabei 0,989.

3.1.2. Dosiseffektkurve

Bei Bestrahlung einer wäßrigen LDH-Lösung unter N_2O -Sättigung werden die entstandenen solvatisierten Elektronen gemäß folgender Gleichung abgefangen (20):



Pro Mol e_{aq}^- wird ein Mol $OH^\bullet$ sowie ein Mol OH^- erzeugt.

Mit Hilfe nachstehender Gleichung läßt sich berechnen, in welchem Ausmaß die bei Bestrahlung einer $7,14 \cdot 10^{-6}$ M LDH-Lösung entstandenen solvatisierten Elektronen durch N_2O abgefangen werden. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der hydratisierten Elektronen mit LDH ist noch nicht bekannt, aber entsprechend bekannten Reaktionsgeschwindigkeiten anderer Proteine mit hydratisierten Elektronen empfiehlt es sich, dabei für die Geschwindigkeitskonstante k der Reaktion der solvatisierten Elektronen mit LDH den Wert $10^{10} [M^{-1} \cdot s^{-1}]$ anzunehmen (15). Die Konzentration des gelösten $N_2O = C_{N_2O}$ beträgt unter den gegebenen Bedingungen 0,05 Mol/l. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion zwischen e_{aq}^- und N_2O hat den Wert $8,7 \cdot 10^9 [M^{-1} \cdot s^{-1}]$ (21).

$$\begin{aligned}
 W_{e^-+N_2O} &= \frac{C_{N_2O} \cdot k_{e^-+N_2O}}{C_{N_2O} \cdot k_{e^-+N_2O} + C_{LDH} \cdot k_{e^-+LDH}} \\
 &= \frac{0,05 \cdot 8,7 \cdot 10^9}{0,05 \cdot 8,7 \cdot 10^9 + 7,14 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{10}} \\
 &= \frac{4,35 \cdot 10^8}{4,35 \cdot 10^8 + 7,14 \cdot 10^4} \\
 &= 0,9998 \quad \longrightarrow
 \end{aligned}$$

$$W_{e^-+N_2O} \sim 1,0 \quad \text{oder} \quad 100 \%$$

Dabei ist $W_{e^-+N_2O}$ die Wahrscheinlichkeit für die Reaktion zwischen e^-_{aq} und N_2O .

Bei den angegebenen Bestrahlungsbedingungen reagieren also keine hydratisierten Elektronen mit der LDH, sondern sie werden vollständig in $OH^\bullet$ -Radikale überführt. Definitionsgemäß entspricht der G-Wert der Zahl der durch Bestrahlung veränderten Moleküle pro 100 eV. Auf Grund genauer Messungen (vergl. Abschnitt 4) beträgt dieser Wert für die Entstehung der OH -Radikale bei der Wasserradio-lyse bei pH 7 unter N_2O 5,35, der für die H -Radikale nur 0,58. Das bedeutet, daß für das Reaktionsgeschehen zu 90 % OH -Radikale verantwortlich sind. Da außerdem die Reaktion des Puffer- und N_2O -Moleküls mit den Radikalen

nur sehr langsam abläuft, kann der Aktivitätsverlust der LDH nur durch OH- und H-Radikale, deren Konzentrationen sich wie 9:1 verhalten, hervorgerufen worden sein.

Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten haben folgende Werte (21):

$$k_{\text{Phosphat} + \text{OH}^\bullet} \geq 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{Phosphat} + \text{H}^\bullet} = 5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{N}_2\text{O} + \text{OH}^\bullet} \approx 10^6 \quad "$$

$$k_{\text{N}_2\text{O} + \text{H}^\bullet} = 1,2 \cdot 10^4 \quad "$$

Unter diesen Bedingungen wurde eine Dosiseffektkurve erstellt. Die Enzymkonzentration der Bestrahlungslösung betrug dabei 1 mg/ml. Aus der graphischen Darstellung s. Abb.5 (es wurde die Restaktivität halblogarithmisch gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen) erkennt man den exponentiellen Aktivitätsabfall mit zunehmender Dosis bzw. Bestrahlungsdauer. Die D_{37} hatte dabei einen mittleren Wert von 123 krd, wobei die Grenzwerte bei 96 und 142 krd lagen. Dieser Wert ist überraschenderweise fast doppelt so hoch wie die unter gleichen Bedingungen ermittelte D_{37} bei Zahn (71,4 krd). Eine mögliche Erklärung dieser Tatsache wird noch in Punkt 4 abzuhandeln sein.

Wie aus der Arbeit von Zahn (15) hervorgeht, ist mit steigender Enzymkonzentration eine höhere Dosis erforderlich, um den gleichen Aktivitätsverlust hervorzurufen.

Untersucht man bei sonst gleichen Bedingungen zwei Dosis-effektkurven, von denen die eine unter N_2 , die andere unter N_2O aufgenommen wurde, so zeigt sich, daß im ersten Falle eine um ca. 30 % höhere Dosis notwendig ist, um den entsprechenden Effekt zu erzielen.

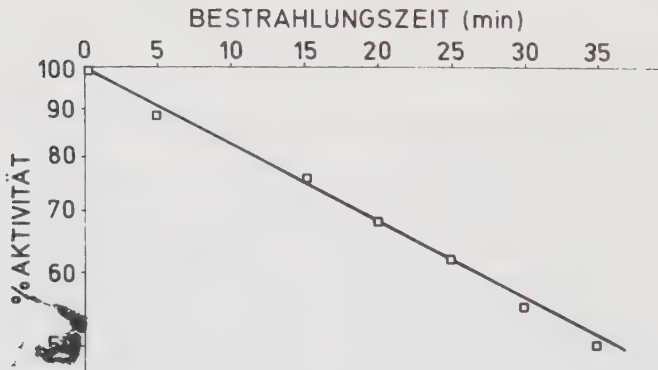


Abb. 5:

Dosiseffektkurve 2 Tage nach Bestrahlung (35 Min. $\pm$ 96 krd)

$$t_{1/2} = 35,90$$

$$D_{37} = 142,48 \text{ krd}$$

3.2. Pufferwahl

Um ein Ausfallen des Enzyms bei der Radiolyse zu verhindern mußte eine möglichst hohe Salzkonzentration angestrebt werden.

Kunigk (10) bestrahlte LDH in 0,067 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,1. Er erzielte dabei eine höhere Aggregatausbeute als Denkl (9) in Gegenwart von 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2 mit einem Zusatz von 1 M NaCl/l. Ein kaliumhaltiger Puffer war jedoch unter den Bedingungen dieser Arbeit ungeeignet, da Kaliumdodecylsulfat unlöslich ist. (22).

Wir verwendeten 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 wie auch Niemczyk und Peuten (14,23), mit deren Ergebnissen die Ergebnisse dieser Arbeit verglichen werden sollen. Darüberhinaus sind Veränderungen am LDH-Molekül durch Aggregation und Dissoziation bei neutralem pH geringer als in saurem oder alkalischen Bereich (24). Unter solchen Bedingungen blieben die Bestrahlungsprodukte stets in Lösung.

3.3. Gelchromatographie über LKB-Gel ACA-34

Bei der Radiolyse von Enzymen entstehen sehr oft Aggregate, die sich durch Gelfiltration vom nativen Enzym abtrennen lassen. Da LDH ein Molekulargewicht von 140 000

hat, können Aggregate dieses Proteins nur auf einem ziemlich großporigen Gel abgetrennt werden. In früheren Arbeiten (14, 15, 23) wurde dazu das Dextrangel Sephadex G-200 verwendet. Dieses Gel ist sehr druckempfindlich und muß sehr sorgfältig behandelt werden, um bei den Trennungen eine ausreichend hohe Durchflußrate zu erzielen. Von der Firma LKB wurde 1975 ein Polyacrylamid-Agarose-Gel für Gelfiltration auf den Markt gebracht, das eine sehr feste und gleichmäßige Struktur besitzt und daher viel weniger druckempfindlich sein soll. Gelchromatographische Trennungen sollen daher mit einer hohen Durchflußgeschwindigkeit erfolgen können und wegen der geringen Diffusion der Enzymprobe ausgezeichnete Trennungen ergeben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun dieses neue Trenngel getestet und Ergebnisse der Trennungen mit denen von Sephadex G-200 verglichen werden.

Da bei der Gelfiltration der unter N_2O bestrahlten LDH über G-200 die Elution des Proteins über sehr viele Fraktionen erfolgte, ohne daß es zu einer guten Auftrennung der Bestrahlungskomponenten kam (15), war zu erwarten, daß mit dem neuen Gel eine verbesserte Trennung zu erzielen sei.

Das Packen der Säule mit dem LKB-Gel Aca-34 verlief einfach und problemlos. Das Gel setzte sich bei Pufferdurchfluß von oben nach unten rasch (in 1 1/2 Tagen) und gleich-

mäßig ab. Das Pufferreservoir befand sich dabei konstant in einer Höhe von etwa 20 - 25 cm Wassersäule. So wurde anfangs eine gute Durchflußrate erzielt. Im Gegensatz dazu mußte beim Packen einer Säule mit Sephadex G-200 zur Gelsedimentation der Druck des Pufferdurchflusses über einen Zeitraum von 3 Tagen stufenweise von 5 auf 15 cm Wassersäule gesteigert werden. Anschließend mußte die Säule umgedreht und der Sedimentationsvorgang analog wiederholt werden. Nur so konnte hierbei eine gleichmäßige Gelpackung mit einer hohen Durchflußrate erzielt werden. An eine Pumpe konnte diese Säule wegen der Empfindlichkeit des G-200-Gels im Gegensatz zur Säule mit LKB-Gel nicht angeschlossen werden. Auch bei der Chromatographie nativer und bestrahlter LDH über LKB AcA-34 ergaben sich hinsichtlich der Trennbreite Vorteile gegenüber Sephadex-G-200.

Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, umfassen die sich jeweils entsprechenden Peaks bei Trennung über das LKB-Gel eine wesentlich kleinere Anzahl an Fraktionen als dies bei Trennung über Sephadex G-200 der Fall ist.

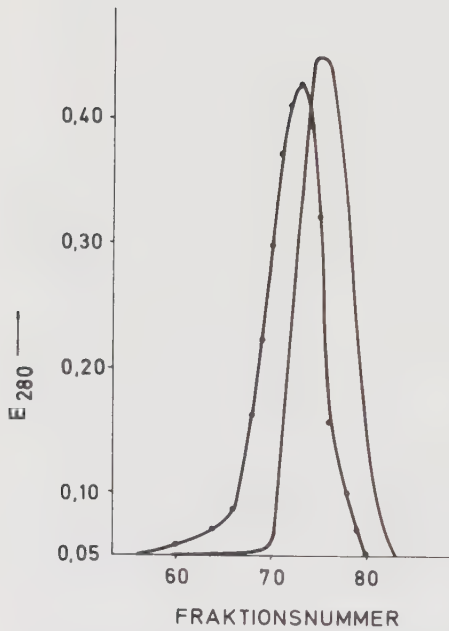


Abb. 6:

Chromatogramme nativer und bestrahlter LDH über LKB-gel AcA 34:

--- native LDH

—○—○— mit 66 krd bestrahlte LDH

Als Ergebnis der Trennungen von nativer und bestrahlter (66 krd) LDH über LKB-AcA-34 erhielten wir, wie die Abbildung zeigt, zwei fast gleiche Chromatogramme. Das ließ den Schluß zu, daß eine Dosis in dieser Höhe noch nicht ausreicht, um eine Molekülveränderung im Sinne einer Aggregation hervorzurufen. Zum gleichen Ergebnis kam Zahn bei Gelfiltrationsstudien mit Sephadex G-200.

Im Laufe der weiteren Untersuchungen traten jedoch bei allen Trennversuchen mittels dieses neuartigen Gels größte Schwierigkeiten auf. So konnte z.B. kein Detergenz wie SDS zugesetzt werden, da die Struktur des Gels dadurch zerstört wird. Da dieses Gel nicht autoklaviert werden kann, wurde Keimfreiheit, wenn überhaupt, nur mit Breitbandantibiotica wie Rifambicin und Chloramphenicol erzielt. Während der Trennung über dieses Gel ging zuviel Protein verloren, die Durchflußgeschwindigkeit bei den einzelnen Versuchen schwankte sehr stark, obgleich die Säule an eine Pumpe angeschlossen war, und schließlich fielen manche Enzymproben, die durchaus entsprechend den Arbeitsbedingungen behandelt worden waren, im Gel aus. Nachdem darüber hinaus an Hand mehrfach wiederholter Versuche feststand, daß unter den Bedingungen dieser Arbeit kein Aggregat, d. h. Teilchen mit dem mehrfachen Molekülvolumen nativer LDH, zu erwarten war, ver-

zichteten wir unter Abwägung aller genannten Vor- und Nachteile, bei weiteren Experimenten auf eine Chromatographie über dieses Gel.

3.4. Konzentrierung der Probe

Um eine Verdünnungsdenaturierung, wie sie bei LDH-Konzentrationen von $< 100 \mu\text{g/ml}$ (26) vorkommt, im weiteren Arbeitsprozeß zu vermeiden, wurden die proteinhaltigen Fraktionen nach der Chromatographie über AcA-34 aufkonzentriert.

Dazu wurden Fritten, deren Boden ein Filterpapier bedeckte, mit je 3 g des Gels G-25 coarse gefüllt. Diesem setzten wir dann pro Fritte 3 Fraktionen ($\hat{=}$ 9 ml) der Proteinlösung zu und ließen es 15 Minuten quellen. Anschließend wurde bei 3000 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang zentrifugiert. Da das Protein nicht in das Gel einzudringen vermochte, blieb es nach der Zentrifugation in der eingeeengten Lösung. Vor der Weiterverarbeitung dieser konzentrierten Enzymlösung wurde photometrisch die Extinktion ermittelt.

Eine Gesamtmenge von z.B. 6,4 mg LDH, die sich auf 12 Fraktionen ($\hat{=}$ 36 ml) aufteilte, wurde in dieser Weise konzentriert. Danach erhielten wir 6 ml Lösung mit einer LDH-Menge von insgesamt nur noch 5,4 mg. Dennoch war diesem Enzymverlust (ca. 15 %) im Gegensatz zur Gefahr der Verdünnungsdenaturierung der Vorzug zu geben.

3.5. Pufferwechsel

Die bestrahlte Enzymprobe war in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst.

Zu unserem Versuchsprogramm gehörte jedoch u.a. auch die Chromatographie unter Zusatz des Detergenzes SDS; dieses fällt allerdings bei einer Salzkonzentration wie sie der Bestrahlungspuffer aufwies, schon nach Zusatz geringer Mengen aus. Deshalb mußte mit Hilfe der Gelfiltration über Sephadex G-75 die Ionenstärke des Puffers auf $I = 0,02$ gesenkt werden, wobei dann das SDS bis einschließlich 4 mM in Lösung blieb (27).

Der von 750Ω zunächst auf 285Ω abfallende und wieder ansteigende Widerstand zeigt den Verlauf des Pufferwechsels von 0,1 M auf 0,01 M. Dabei betrug der Widerstand des 0,1 M Puffers 146Ω , der des 0,01 M 990Ω .

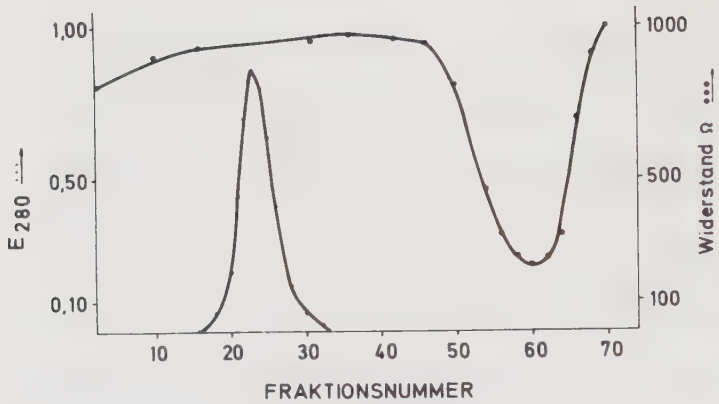


Abb. 7:

Verlauf des Pufferwechsels von 0,1 M auf 0,01 M mittels Gelfiltration über Sephadex G-75.

3.6. Gelchromatographie

3.6.1. Auftrennung in Gegenwart von SDS

Das Detergens SDS vermag Bindungen nicht kovalenter Art abzuschwächen bzw. aufzuheben. Dabei kann es in wäßriger Lösung entweder in der an das Enzym gebundenen monomeren Form vorliegen, oder als Micellaraggregat, das aber nicht mit dem Protein in Reaktion tritt (28).

Das Konzentrationsverhältnis beider Formen hängt von der gesamten SDS-Konzentration, der Ionenstärke sowie von der Temperatur der betrachteten Lösung ab. Übersteigt die SDS-Molarität eine gewisse Grenze, wird jedes dem System weiterhin zugeführte SDS-Molekül einer Micelle einverleibt. Diese kritische Micellarkonzentration sinkt mit steigender Ionenstärke bei konstanter Temperatur (28).

Die Dissoziationsbedingung von $\text{SDS:LDH} = 1,4 \text{ g} : 1 \text{ g}$ kann mit einer 3 mM SDS-Lösung und einer LDH-Konzentration von 0,6 mg/ml ohne Überschreiten jener kritischen Micellarkonzentration erreicht werden (28, 29, 30).

Wegen der Löslichkeit des SDS in 0,01 M Phosphatpuffer war die SDS-Konzentration auf 3 mM begrenzt, das SDS/LDH g/g-Verhältnis konnte also nur durch eine entsprechende Verringerung der Enzymmenge erhöht werden.

Hydrophobe Wechselwirkungen werden im wesentlichen bei einem SDS/LDH - Verhältnis von 0,33 g/g aufgehoben (27), elektrostatische Bindungen hingegen bei einem Gewichtsverhältnis von 1,4 g SDS/g LDH (14).

Unsere Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf die Gelfiltration über Sephadex G-10.

Als erstes stellten wir mittels Blue Dextran das Ausschlußvolumen = V_0 fest. Der Trennbereich dieses Gels geht für Peptide bis zu einem Molekulargewicht von 700.

Für die folgenden Versuche bestrahlten wir das Protein mit einer von 33 auf 96 krd ansteigenden Dosis. Das SDS/LDH - Verhältnis lag abgesehen von einer Ausnahme, wo wir versuchsweise 1,8 g/g verwendeten, stets bei 1,4 g SDS/g LDH. Wie die abgebildeten Chromatogramme (Abb. 8 und 9) zeigen, wurden alle Enzymproben um im Mittel 3,5 Fraktionen später als V_0 eluiert. Das ließ zunächst zwar an das Vorhandensein multipler Brüche denken, doch mußten wir diese Vermutung leider revidieren, als wir anschließend native LDH mit SDS im Verhältnis 1,4 g/g sowie 1,8 g/g auftrennten. Völlig unerwartet erschien die mit weniger SDS versetzte Lösung in Fraktion 32, die Lösung hingegen, der 1,8 g SDS/g LDH zugesetzt worden war, kam im V_0 zur Elution. Auffallend war weiterhin, daß sich das Elutionsvolumen der einzelnen En-

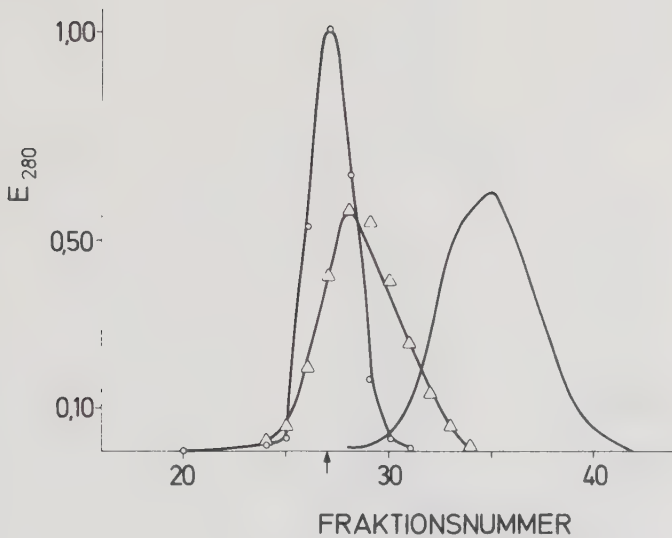


Abb. 8:

Chromatographie nativer LDH über Sephadex G-10:

o—o—o Blue Dextran

•—•—• native LDH, versetzt mit 1,4 g SDS/g LDH

Δ — Δ — Δ native LDH, versetzt mit 1,8 g SDS/g LDH

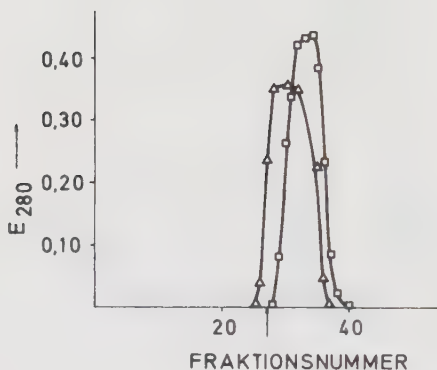
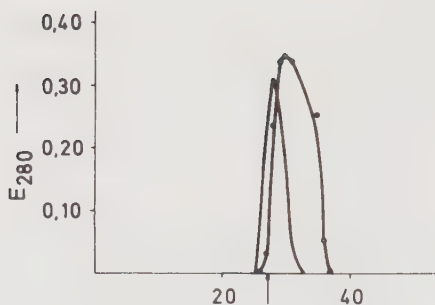


Abb. 9:

Chromatogramme unterschiedlich bestrahlter LDH über Sephadex G-10;

- · - · - · nach Bestrahlung mit 66 krd
- o - o - o - nach Bestrahlung mit 57 krd
- Δ - Δ - Δ - nach Bestrahlung mit 44 krd
- □ - □ - □ - nach Bestrahlung mit 33 krd

zymproben mit steigender Dosis dem V_0 stark annäherte, und die mit 66 krd bestrahlte Probe letztlich auch in V_0 eluiert wurde. Diesen überraschenden Effekt vermochten wir nur auf Wechselwirkungen der hochpolymeren Gelmatrix mit den LDH - Molekülen, wie sie auch in der Literatur beschrieben werden, zurückführen (siehe Abschnitt 4).

Um diese Ergebnisse besser beurteilen zu können und um eventuell doch vorhandene Brüche, die bislang nur durch Wechselwirkungen verschiedenster Gruppen miteinander maskiert waren, darstellen zu können, gingen wir zur Gelfiltration auf Sephadex G-75 über; dessen Ausschlußgrenze liegt für globuläre Proteine bei einem Molekulargewicht von etwa 70 000. Auch hier wurde zunächst die Position von V_0 sowie gleich anschließend die nativer LDH festgelegt. Das native Enzym kam hier erwartungsgemäß im Ausschlußvolumen zur Elution. Wir wiederholten nun die vorangegangenen Versuche, wobei wir abermals die Dosis von 33 auf 96 krd ansteigen ließen. Das SDS/LDH - Verhältnis blieb mit 1,4 g/g, bis auf einen Versuch, bei dem wir zugunsten einer höheren Molarität 1,75 g SDS/g LDH zusetzten, ebenfalls gleich. Das Ergebnis aller Filtrationsversuche war, was unsere Erwartungen in Hinsicht auf Peptidkettenbrüche betrug, enttäuschend. Wie aus der Abbildung 10 ersichtlich wir, wurden nun sämtliche Enzymproben in V_0 eluiert.

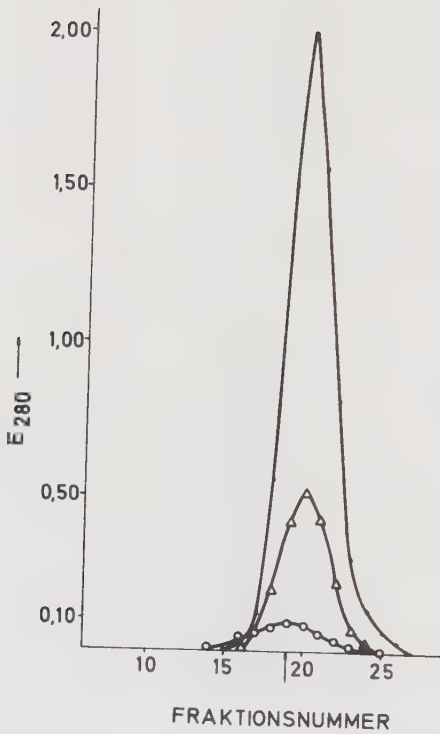


Abb. 10:

Chromatographie nativer und bestrahlter LDH über
Sephadex G-75;

- - - - - native LDH (15 mg)

-o-o-o- nach Bestrahlung mit 57 krd (1,1 mg)

-Δ-Δ-Δ- nach Bestrahlung mit 66 krd (4,0 mg)

Um jedoch Kettenbrüche bis zu einer Dosis von 96 krd mit Sicherheit ausschließen oder nachweisen zu können, schien uns die Trennung über Sephacryl S-200 das Mittel der Wahl. Wir verwendeten dieses ebenfalls neuartige Gel anstelle von Sephadex G-200, da es gegenüber diesem gewisse Vorteile bietet: die Säule läßt sich leicht packen, die Durchflußrate ist ausreichend hoch, es läßt sich im Gegensatz zum bereits beschriebenen LKB-Gel AcA-34 sterilisieren und erlaubt die Verwendung von Detergentien. (Dies ist allerdings auch bei G-200 möglich).

Native LDH wurde hier im Vergleich zum Ausschlußvolumen, das wiederum mit Blue Dextran bestimmt worden war, verzögert eluiert: Blue Dextran wird mit einer maximalen Konzentration in Fraktion 24 eluiert, native LDH hingegen in Fraktion 29. Anschließend chromatographierten wir eine LDH-Lösung, die vorher mit einer Dosis von 96 krd bestrahlt worden war und SDS im Verhältnis 1,4 g : 1 g enthielt. Die Hauptmenge des Proteins wurde dabei mit einem Maximum in Fraktion 27 (siehe Abb. 11) eluiert. Auf Grund der gemessenen Extinktionen im Eluat kam sehr viel mehr Protein zur Elution oder aber der Extinktionskoeffizient hatte sich verändert. Dies hielten wir jedoch für unwahrscheinlich, da es noch bei keinem der vorausgegangenen Versuche beobachtet worden war. Ein weiterer Peak erschien mit einem Maximum bei Fraktion 70. Um zu klären, ob auch dieser Peak möglicherweise

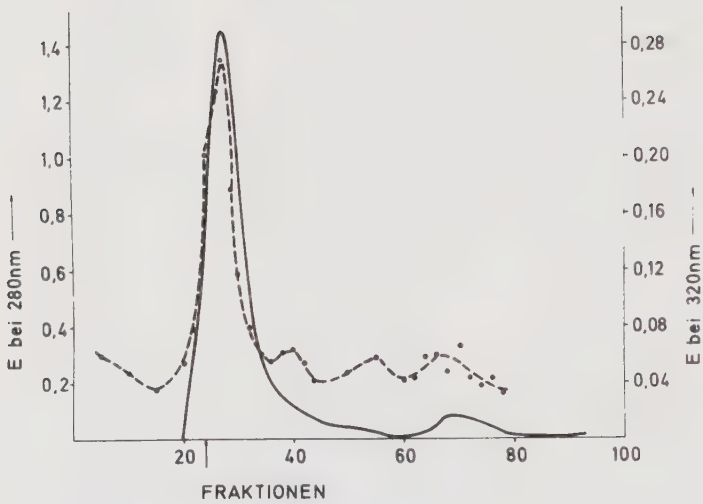


Abb. 11:

Auftrennung einer mit 96 krd bestrahlten und mit entsprechender Menge SDS versetzten LDH - Lösung über Sephadexyl 200;

-o-o-o- zeigt den Proteinnachweis nach Biuret

se Protein enthielt, wurde die Proteinbestimmung nach Biuret durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2.1.). Leider erwies sich diese Methode als zu unempfindlich, so daß nicht geklärt werden konnte, ob nun in den Fraktionen 60 - 80 Protein zur Elution gekommen war oder nicht.

3.6.2. Gelfiltration nach Reduktion

Native LDH verfügt über 22 SH-Gruppen, besitzt jedoch keine S-S-Bindungen.

Peuten (23), der das Enzym einer Röntgenbestrahlung von 200 krd unter N_2 in wäßriger Lösung aussetzte, konnte eine Auftrennung des von ihm untersuchten tetrameren Peak erst nach Reduktion des Enzyms mit 1 %igem Mercaptoäthanol erzielen. Eine derartige Inkubation wird im allgemeinen angewandt, um S-S-Bindungen zu reduzieren und eine Rückoxidation von SH-Gruppen zu vermeiden.

Es lag die Vermutung nahe, das von uns bestrahlte Enzym könne ein ähnliches Verhalten aufweisen. Dazu inkubierten wir die bestrahlte Lösung mit und ohne SDS mit 1 %igem Mercaptoäthanol unterschiedlich lange, sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 37° C im Wasserbad. Nur bei einer Inkubationsdauer von 2 Stunden bei 37° C im Wasserbad und unter Zusatz von 1,4 g SDS/g LDH blieb das Protein in Lösung und konnte anschließend chromatographiert werden. Die Trennungen erfolgten zu-

nächst über G-10 sowie G-75. Bei der Auftrennung über G-10 verhielt sich die reduzierte LDH - Lösung wie das mit 66 krd bestrahlte, nicht reduzierte Protein, bzw. wie die mit 1,8 g SDS/g LDH versetzte native Enzymlösung: das Maximum erscheint, wie die Abbildung erkennen läßt, bei Fraktion 28 und damit im Ausschlußvolumen (Abb.12).

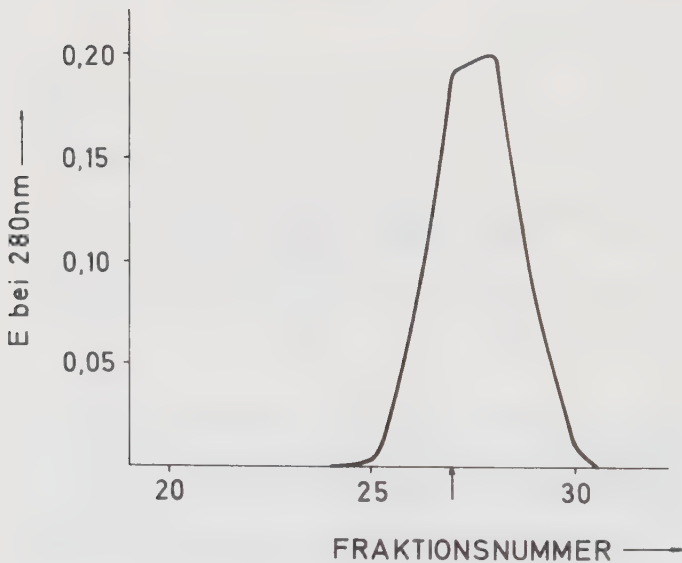


Abb. 12:

Chromatogramm bestrahlter (66 krd) und reduzierter LDH über Sephadex G-10;

Die Trennung über G-75 lieferte uns ein Chromatogramm, das Identität mit allen anderen, die ohne vorherige Reduktion aufgenommen worden waren, zeigt (Abb. 13).

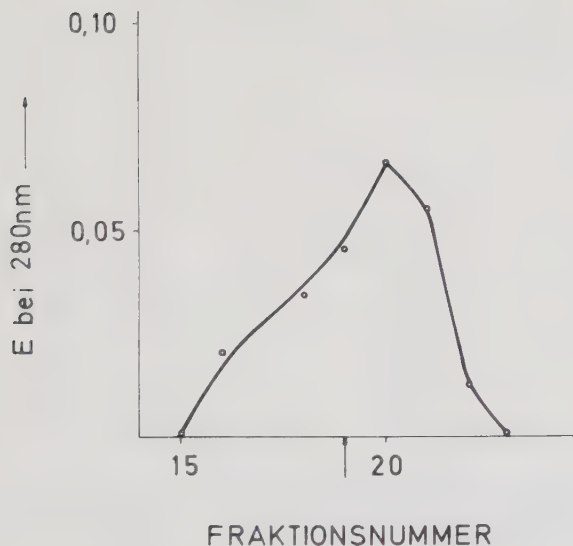


Abb. 13:

Chromatogramm bestrahlter (58 krd) und reduzierter LDH über Sephadex G-75;

Da uns diese Ergebnisse im Hinblick auf eventuelle Peptidkettenbrüche jedoch keine weiteren Aufschlüsse erbrachten, unternahmen wir nun noch Trennversuche reduzierter LDH über Sephacryl S-200: Das Chromatogramm nativer reduzierter LDH mit entsprechender Menge SDS hatte dabei ein Maximum bei Fraktion 25, was einer Elution in V_0 (Fraktion 24) entspricht (Abb. 14).

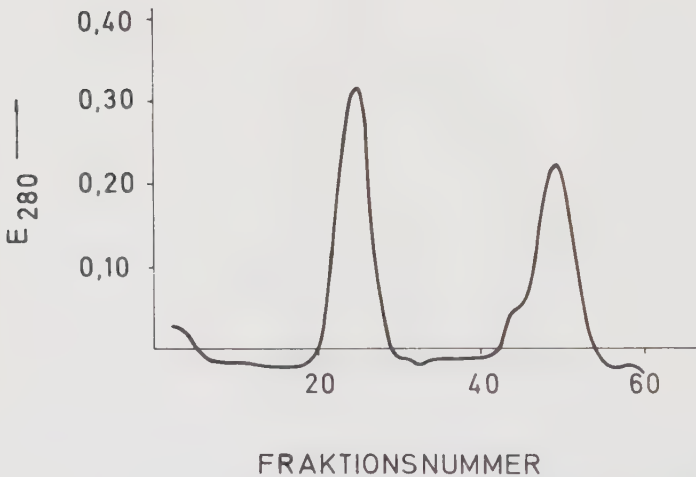


Abb. 14:

Chromatogramm nativer, reduzierter und mit SDS versetzter LDH über Sephacryl S-200;

Im zweiten Peak dieser Abbildung werden offensichtlich Mercaptoäthanol bzw. Oxidationsprodukte desselben eluiert. Der im Anschluß an diesen Versuch durchgeführte Folin-Test ergab, sowohl für den ersten wie für den zweiten Peak, eine starke Blaufärbung. Da diese Folinbestimmung ohne Zusatz von H_2O_2 erfolgt war (siehe Abschnitt 2.2.2.1.), ist die Verfärbung des 2. Peak auf eine Reduktion des Folin-Reagenzes durch das Mercaptoäthanol zurückzuführen. Zum Vergleich wurde nun eine mit 96 krd bestrahlte, reduzierte und mit ausreichender Menge SDS versetzte LDH-Lösung über S-200 aufgetrennt (Abb.15, Versuch Nr. 1). Dabei wurde das Protein als ein Peak mit einem Maximum ebenfalls bei Fraktion 25 eluiert. Unter Annahme eines konstanten LDH-Extinktionskoeffizienten kam das gesamte Protein in diesem einen Peak zur Elution. Da der Extinktionswert ab Fraktion 36 auf dem Isco-Monitor wieder deutlich anstieg, wurde das Eluat mit Folin-Reaktion unter Zusatz von H_2O_2 (siehe Abschnitt 2.2.2.1.) auf etwaiges Protein getestet. Als Hinweis auf Peptidbrüche könnten die schwache Färbung mit Folin bei Fraktion 48 und 49 sowie der für die angewandte Menge an Reduktionsmittel (75 μ l) viel zu hohe Extinktionsanstieg des 2. Peak (0,548) gelten (Abb.15)

Um die bei Fraktion 44 aufgetretene kleine Zacke abklären zu können wurde derselbe Versuch unter genau gleichen Bedingungen wiederholt (siehe Abb. 16) Dabei war

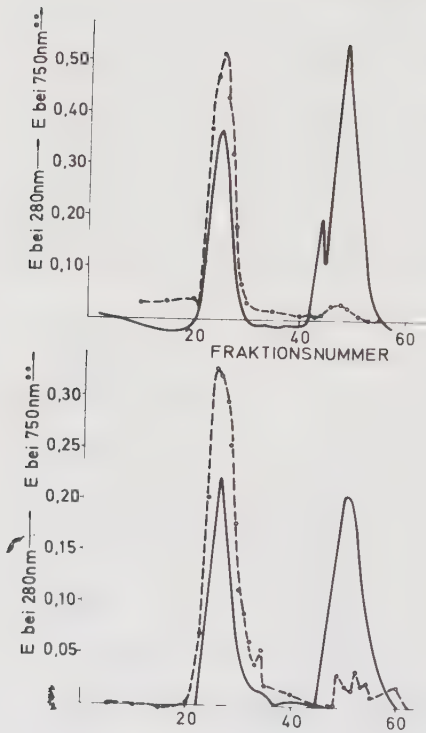


Abb. 15 und 16:

Auftrennung bestrahlter (96 krd) reduzierter, mit SDS versetzter LDH über Sephacryl 200;

-o-o-o- zeigt den Proteinnachweis nach Folin

dieser extrem schmale Peak nicht reproduzierbar und der Extinktionsanstieg des 2. Peak (0,210) war trotz größerer Menge Mercaptoäthanolis (100 µl) bedeutend niedriger als bei Versuch 1.

Auch hier erbrachte die Folin-Proteinbestimmung kein eindeutiges Ergebnis. Dabei war in beiden Versuchen der Reduktionsvorgang ohne vorherige pH-Wert-Kontrolle durchgeführt worden.

Im anschließenden Versuch wurde der bestrahlten, reduzierten und mit SDS versetzten LDH-Probe noch Jodacetamid zugesetzt, um eine etwaige Rückoxidation von SH-Gruppen zu verhindern. Dies machte erstmals eine pH-Wert-Kontrolle notwendig, da die Alkylierung bei pH 8,6 ablaufen soll. Nachdem sich beim Nachprüfen ein sehr niedriger pH-Wert ergeben hätte, wurde die Lösung mit 1 N NaOH auf pH 8,6 eingestellt. Wie die Abbildung 17 zeigt, kam auch bei dieser Trennung das Protein mit einem Maximum bei Fraktion 26 zur Elution; mit der Folin-Bestimmung trat eine Blaufärbung mit einem Maximum in Fraktion 49 auf. Vermutlich wurde sie aber durch Jodacetamid hervorgerufen. Daher bleibt auch bei diesem 2. Peak der Proteingehalt fraglich. Möglich wäre daher ein Proteinbruchstück, das gemeinsam mit dem Reduktions- und dem Alkylierungsmittel eluiert wird und sich daher einem Proteinnachweis mittels Folin wegen Störung durch Jodacetamid entzieht.

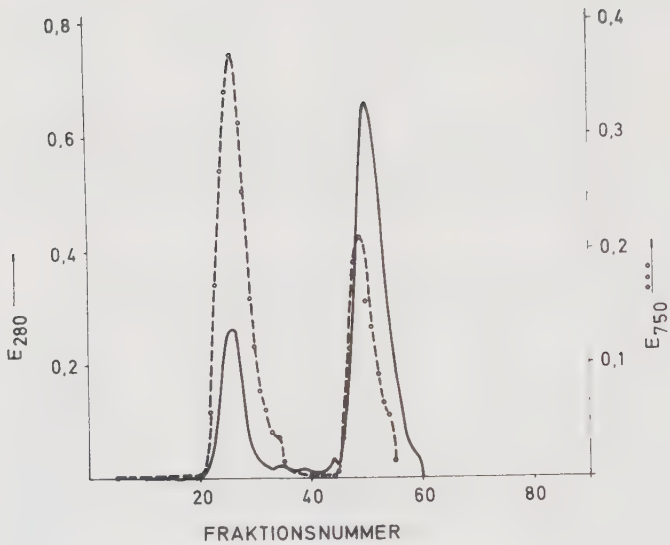


Abb. 17:

Auftrennung bestrahlter (96 krd), reduzierter, mit Jod-acetamid alkylierter LDH, versetzt mit der entsprechenden Menge SDS;

-o-o-o- Proteinnachweis nach Folin

Um endgültigen Aufschluß über den Gehalt des 2. Peak zu bekommen, schien dessen Auftrennung über das engmaschige Sephadex G-10 notwendig. Dazu wiederholten wir die Auftrennung der bestrahlten und reduzierten LDH über S-200 mit SDS. Dabei wurde die Reduktion erstmal bei erhöhtem pH, nämlich pH 8,6 durchgeführt (Abb. 18)

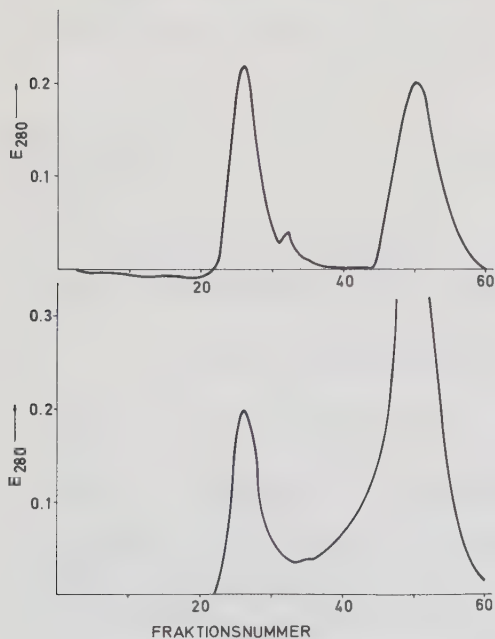


Abb. 18:

Auftrennung bestrahlter (96 krd), bei pH 8,6 reduzierter LDH mit SDS über S-200

Nach dieser Reduktion war der 1. Peak nur wenig kleiner als der von Abbildung 16 bzw. 16*, wobei sich in jenem Versuch der Reduktionsvorgang allerdings noch in saurem Milieu vollzogen hatte. Ein Extinktionsanstieg ergab sich nach Reduktion bei pH 8,6 dann wieder ab Fraktion 38, während nach Reduktion bei saurem pH-Wert die Extinktion erst bei Fraktion 44 zunahm.

Die Auffälligste Diskrepanz beider Chromatogramme (18 und 16* ergab sich durch den Größenunterschied des 2. Peak, wie die Abbildungen deutlich zeigen.

Anschließend wurden von den Fraktionen 41 - 46, sowie 55 - 60 des letzten Versuches, die im folgenden weiter über G-10 getrennt werden sollten, UV-Spektren aufgenommen. Dabei ließen sich zwei verschiedene Substanzen erkennen:

Fraktionen 41 - 46 Maximum bei 290 nm

Fraktionen 55 - 60 ansteigend von 300 nach 220 nm

Diese 2 Gruppen wurden sodann über G-10 in 0,2 M Essigsäure chromatographiert. Die Fraktionen 41 - 46 kamen mit einem Maximum bei Fraktion 33 zur Elution. Diese Substanz, die ja auch ein proteinähnliches Spektrum aufgewiesen hatte (Max. bei 290 nm), konnte damit eindeutig von jener 2. Substanz abgetrennt werden, die mit einem Maximum bei Fraktion 75 eluiert worden war (Abb. 19). Aus deren Spektrum, das ansteigend von 300 nach 220 nm verlief ging damit klar hervor, daß es sich hierbei keinesfalls um Protein handeln konnte. Möglicherweise kamen hier Oxidationsprodukte des Re-

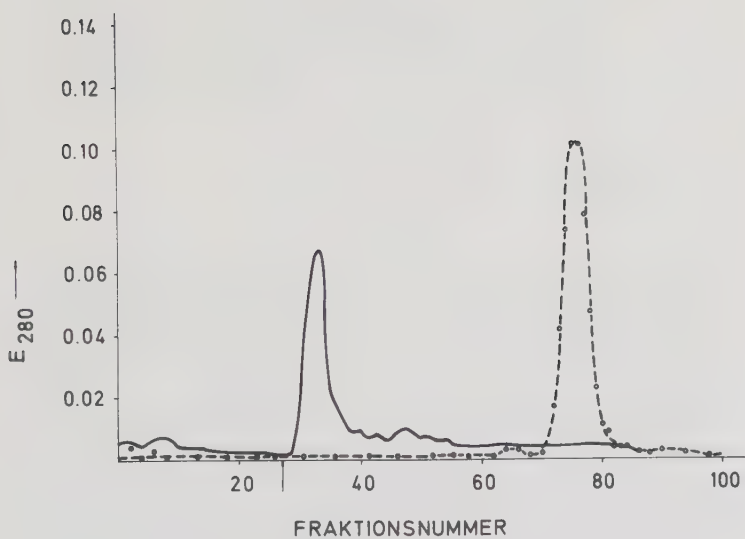


Abb. 19:

Auftrennung des 2. Peak von Abb. 18 über G-10;

duktionsmittels zur Elution.

Alle Ergebnisse zusammenfassend läßt sich sagen, daß unter den dieser Arbeit zugrunde gelegten Bedingungen strahleninduzierte Peptidkettenbrüche nachweisbar sind. Mögliche Ursachen dafür werden unter Punkt 4 abzuhandeln sein.

4. Diskussion

Vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, ob die nach Radiolyse von LDH nachgewiesenen Peptid-Kettenbrüche durch Reaktion der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale entstehen. Dazu wurde das Enzym in 0,1 M Na-Phosphatpuffer gelöst und nach Sättigung mit N_2O einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt. Unter dieser Bedingung werden nach der unter 3.1.2. genannten Gleichung durch N_2O praktisch alle durch die Radiolyse des Wassers entstandenen hydratisierten Elektronen (e_{aq}^-) abgefangen und in $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale überführt (und zwar entsteht pro Mol e_{aq}^- ein Mol $\text{OH}^{\bullet}$ und ein Mol OH^-), sodaß der Anteil der H-Radikale nur noch einen Prozentsatz von 10 % der reagierenden Radiolyseprodukte ausmacht (15). Entscheidend für die Wirksamkeit der Radikale am Protein ist auch die Tatsache, daß deren Reaktionen mit den Puffer- und N_2O -Molekülen vernachlässigbar langsam ablaufen (siehe auch 3.1.2.). Die entstehenden OH^- -Ionen werden ab-

gepuffert und können so nicht störend auf den pH-Wert einwirken (Abschnitt 3.1.2. genaue Berechnung). Alle am Proteinmolekül auftretenden Veränderungen sind damit fast ausschließlich auf die Reaktion der OH-Radikale mit dem Enzym zurückzuführen.

Aus der Darstellung der Dosiseffektkurve ging hervor, daß die Inaktivierung in exponentieller Abhängigkeit von der Dosis erfolgte, was in der Gleichung im Abschnitt 2.2.4.3. zum Ausdruck kommt. Bestätigt wird dies Verhalten für fast alle Enzyme, wie z.B. Peroxidase, Chymotrypsin und Trypsin (32, 33), Ribonuclease (19, 34, 35, 36, 37, 13, 11), Alkoholdehydrogenase (38) sowie für LDH (9, 10, 14, 27, 23, 39, 40). Unterschiedliche Gasatmosphären und zusätzlich applizierte Radikalfänger spielten dabei keine Rolle. Nur für Papain diskutiert man eine lineare Beziehung (41), die damit begründet wird, daß die Primärradikale nur an einer einzigen, für das enzymatische Zentrum wichtigen SH-Gruppe angreifen.

Bemerkenswert scheint die Diskrepanz zwischen der D_{37} dieser Arbeit und derjenigen bei Zahn. Während unter den vorliegenden Arbeitsbedingungen im Mittel 123 krd benötigt wurden um eine Inaktivierung von 63 % zu erzielen, brauchte Zahn unter gleichen Bedingungen dafür nur 71 krd. Desweiteren erwies sich die Aktivität unserer Lösung, die 2 1/2 Stunden, 1 und 2 Tage nach

nach der Bestrahlung gemessen wurde, konstant: wir erhielten stets eine Restaktivität von ungefähr 50 %, d.h. es waren offensichtlich keinerlei Nachreaktionen abgelaufen. Dies steht im Einklang mit der von Kunigk (10) und Niemczyk (14) nach einer Woche resp. 9 Tagen gefundenen Konstanz der Ergebnisse, wobei diese Autoren allerdings unter N_2 bestrahlt hatten. Dem widerspricht das Ergebnis von Zahn, bei dem die D_{37} nach 2 Tagen um etwa 10 krd abgefallen war. Eine mögliche Erklärung dieser gravierenden Unterschiede bezüglich der jeweils gefundenen Meßergebnisse bei gleichen Bedingungen könnte nur darin zu sehen sein, daß jeder Untersucher ein anderes Enzympräparat, d.h. eine andere Charge benutzte.*

Eine eindeutige Aussage über die Wirksamkeit von Radikalen ermöglicht die Berechnung des G-Wertes (Def. siehe Abschnitt 3.1.2.). Dabei sind die Werte für die 100 eV-Ausbeuten der einzelnen Wasserradikale bei Röntgenstrahlen unter N_2O und pH 7,0 folgende:

$$G(OH^{\bullet}) = 5,45$$

$$G(H^{\bullet}) = 0,55$$

$$G(e_{aq}^{-}) = 0$$

* Nach Abschluß dieser Arbeit wurde festgestellt, daß für die Strahlenempfindlichkeit des Enzyms entscheidend wichtig ist, wie lange das Präparat vor der Bestrahlung z.B. bedingt durch den Transport Temperaturen $>20^{\circ}C$ ausgesetzt war.

Die entsprechenden Werte für die Bestrahlung unter N_2 lauten:

$$G(OH^\bullet) = 2,70$$

$$G(H^\bullet) = 0,58$$

$$G(e_{aq}^-) = 2,65$$

Im vorliegenden Fall gehen wir aus von der Anfangskonzentration des Enzyms und der dazugehörigen D_{37} , bei der 63 % der vorhandenen Proteinmoleküle strahlenbedingt verändert sein müssen.

Die Enzymkonzentration wird mit Hilfe der Loschmidt'schen Zahl (nach dem Satz von Avogadro) von Mol/Liter auf die Zahl der Moleküle/Liter umgerechnet ($N_L = 6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle $\cdot$ Mol $^{-1}$). Die Energiedosis gemessen in krd läßt sich umrechnen in eV/g, da 1 krd $6,24 \cdot 10^{16}$ eV/g entspricht. Weiterhin entspricht einer LDH-Lösung von 1mg/ml die Menge $7,14 \cdot 10^{-9}$ Mol/g Lösung. Man erhält so folgende Gleichung:

$$G = \frac{0,63 \cdot 7,14 \cdot 10^{-9} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 10^2 \cdot [E]}{D_{37} \text{ (krd)} \cdot 6,24 \cdot 10^{16}}$$

$$= \frac{4,34 \cdot [E]}{D_{37} \text{ (krd)}}$$

dabei entspricht $[E]$ der jeweiligen Enzymkonzentration in mg/ml.

Die bei einer Konzentration von 1 mg/ml gefundenen G-Werte unter N_2O sind dabei im Mittel um ~ 45 % größer als unter N_2 bei 1 bzw. auch 3,1 mg/ml (15). Unter N_2O

erreicht die Inaktivierung bei gleicher Dosis normalerweise also ein größeres Ausmaß. Buchanan und Armstrong (31) fanden nach Bestrahlung einer mit N_2O gesättigten LDH-Lösung bei Konzentrationen oberhalb von 1 mg/ml einen G' -Wert für die Inaktivierung von $G = 0,16$. Allerdings verwendeten diese Autoren LDH aus Rinderherz, d.h. LDH-H₄, während wir LDH-M₄ untersuchten. Darüberhinaus führten Buchanan und Armstrong die Radiolyse des Enzyms in 5×10^{-4} M Phosphatpuffer durch, während wir 10^{-1} M Phosphatpuffer verwendeten. Erniedrigten wir diese Ionenkonzentration, denaturierte das Enzym bereits ohne Einwirkung von Strahlung sehr leicht.

Im folgenden eine Zusammenstellung von G-Werten und der entsprechenden D_{37} unter den jeweiligen Versuchsbedingungen:

C mg/ml	D_{37} (krd)	G-Wert (Inaktivierung)	Puffer, pH	Gas	Quelle
1,0	123	0,035	0,1M Phosphat 7,0	N_2O	eigene Arbeit
1,0	71,4	0,064	"	N_2O	Zahn
1,0	106	0,041	"	N_2	Peuten
3,1	280	0,048	"	N_2	Niemczyk

Unter Bezugnahme auf die von anderen Autoren (Zahn, Niemczyk, Kunigk) gefundene Aggregatbildung bestrahlter LDH-Lösung läßt sich an Hand dieser Arbeit folgendes aussagen:

Die Chromatographie einer Proteinlösung der Konzentration 1 mg/ml über LKB-Gel AcA 34, bei der das Enzym vorher konsekutiv mit 33-72 krd unter N_2O bestrahlt worden war, erbrachte, daß bis zu einer Dosis von einschließlich 72 krd keine auffällige Größenveränderung, d.h. daß keine Aggregation am Molekül stattzufinden scheint.

Dies stimmt gut mit dem Ergebnis von Zahn überein, der unter gleichen Versuchsbedingungen über Sephadex-G-200 chromatographierte. Dieser Autor zeigte, daß erst ab einer Dosis von 96 krd chromatographisch deutlich sichtbare Veränderungen der räumlichen Ausdehnung des Molekülverbandes auftreten.

Bei Bestrahlung einer Proteinlösung gleicher Konzentration mit 200 krd jedoch unter N_2 (23), schien hingegen eine Größenveränderung im Sinne einer Aggregation gerade erst begonnen zu haben. In diesem Fall nimmt der Anteil der Aggregation entweder mit steigender Enzymkonzentration (10), oder aber bei gleichbleibender Enzymkonzentration mit steigender Dosis zu.

Die Bestrahlung einer Enzymprobe (1mg/ml) mit 120 krd unter N_2O führte bei Zahn zu einer derart starken Ausfällung ($\hat{=}$ Aggregation), daß die Lösung nicht mehr chro-

matographierbar war. Deshalb bestrahlten wir im weiteren Verlauf dieser Arbeit maximal mit 96 krd, da nach Zahn eben schon bei Dosen knapp über 96 krd eine Ausfällung auftreten kann. Nachdem feststand, daß bis zu einer Dosis von 96 krd keine Aggregatbildung auftrat, wurden die bestrahlten Proben nicht mehr über großporige Gele, wie AcA-34 oder G-200 chromatographiert, sondern in einen Puffer niedriger Ionenstärke überführt und mit entsprechenden Mengen SDS versetzt.

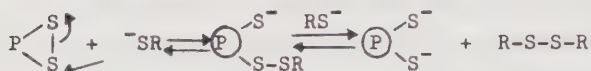
Die Wechselwirkung von SDS mit Protein war bereits Gegenstand vieler Untersuchungen in den letzten Jahren (4, 27, 22, 29, 30, 42). Auf Grund verschiedenster Untersuchungsverfahren diskutiert man die Bildung gemischter Micellen zwischen der hydrophoben aliphatischen Kette des SDS und den hydrophoben (aliphatischen und aromatischen) Proteinseitenketten (43, 44).

Die damit verbundene Abnahme der hydrophoben Wechselwirkungen (die u.a. die Konformation des Proteins stabilisieren) nichtpolarer Enzymseitenketten führt zu einer Konformationsänderung des Moleküls im Sinne einer Entfaltung. Die hydrophilen SO_4^{2-} -Gruppen des gebundenen SDS sind dabei dem umgebenden Lösungsmittel zugewandt und bewirken eine negative Ladung des gesamten Molekülkomplexes (45). Die daraus resultierenden Abstoßungseffekte führen zur Aufhebung intra- und inter-

molekularer elektrostatischer Wechselwirkungen. Der SDS-Proteinkomplex besitzt eine stäbchenähnliche Gestalt, dessen Länge nur vom Molekulargewicht des Proteins abhängt. - Bestimmend für die Wechselwirkungen beider Komponenten ist das Gramm zu Gramm-Verhältnis SDS/Protein und nicht etwa die Molarität der SDS-Lösung: Das Bindungsverhältnis SDS/Protein auf einer g/g - Basis ist für eine große Anzahl reduzierter Proteine identisch. Zwischen 5 und $8 \cdot 10^{-4}$ M SDS bildet sich ein gesättigter Komplex von $0,4$ g SDS/g LDH, oberhalb einer Konzentration von $8 \cdot 10^{-4}$ M entsteht ein zweiter Komplex von $1,4$ g SDS/g LDH. Dabei gelangt nur die monomere Form des Detergenzes zur Proteinbindung, nicht dagegen die Micellarform (siehe auch Abschnitt 3.6.1.). Sowohl beim nativen als auch beim bestrahlten Protein sollten identische Bindungsverhältnisse herrschen; bei einem Gewichtsverhältnis von $1,4$ g SDS/g LDH sollte die LDH vollständig in ihre Untereinheiten dissoziiert vorliegen. SH-Gruppen des Enzyms, die sonst im Inneren des Moleküls verborgen liegen, treten dann nach außen.

Bei der Radiolyse von LDH kann es zur Bildung neuer kovalenter S-S-Bindungen kommen. Kunigk (10) fand nach Bestrahlung dieses Enzyms eine Neubildung der Aminosäure Cystin und führte dies darauf zurück, daß während der Radiolyse 2 Cysteinmoleküle durch S-S-Brückenbildung in Cystin übergingen. Diese Disulfidbindungen können sowohl inter- als auch intramolekularer Art sein.

Um nun eine Maskierung etwaiger Peptid-Kettenbrüche durch derartige kovalente Bindungen, wie sie von Hamilton, Alexander Hayden et al. (25) diskutiert wird, auszuschließen, hatten wir die bestrahlte Lösung mit Mercaptoäthanol reduziert. Dabei läuft folgende Reaktion ab (47):



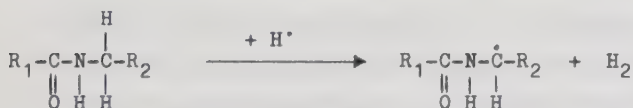
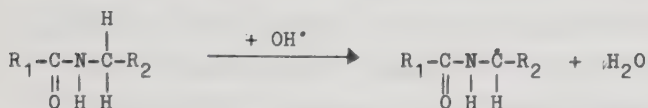
(P ≙ Protein; R ≙ Reduktionsmittel)

Bei der Auftrennung so reduzierter LDH über S-200 zeigte sich, daß ein derartiger Reaktionsmechanismus tatsächlich abgelaufen sein mußte:

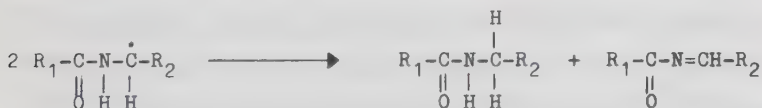
Die bestrahlte, im sauren Milieu reduzierte LDH-Lösung wurde im Gegensatz zur bestrahlten, aber nicht reduzierten im V_0 eluiert; d.h. die hydrodynamische Gestalt der Moleküle war durch die Reduktion im Sinne einer Vergrößerung ihrer räumlichen Ausdehnung verändert worden. Dies bedeutet, daß es zur Spaltung intramolekularer Disulfidbindungen gekommen sein mußte. Nach Haskill und Hunt (11) wäre bei der Reduktion allerdings auch eine Molekularvergrößerung durch Ausbildung schwacher Peroxid-Brücken möglich. Da die Abtrennung des Bruchstücks erst nach Reduktion der Lösung im alkalischen Bereich auftrat, wäre weiterhin denkbar, daß bei basischem pH nun auch intermolekulare S-S-Brücken aufgespalten werden. Allerdings käme für den Effekt der Abtrennung auch noch eine Enzymradikalreaktion in Frage, wie sie nachfolgend beschrieben wird. Daß die beiden Ergebnisse, Spaltung

von S-S-Bindungen und Abtrennung des Bruchstücks bei den Trennungen über Sephadex G-10 und G-75 nicht zu finden waren, lag zum einen am Trennbereich der Gele, zum anderen wohl daran, daß über beide Säulen nur die im Säuren reduzierten Lösungen chromatographiert worden waren. Bei der Radiolyse der LDH können neben den Disulfidbrücken auch neue C-C-Bindungen als Folge einer Peptidbindungs-spaltung entstehen. Garrison et al. (48, 49) diskutieren dabei folgenden Mechanismus:

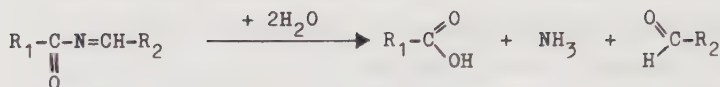
Radiolytisch entstandene $H^\bullet$ - und $OH^\bullet$ -Radikale entreißen C_α -Atomen Wasserstoff:



Diese Produkte können eine Disproportionierungsreaktion eingehen oder direkt miteinander reagieren. Die Disproportionierung führt zur Bildung eines Dehydropeptids:



Dieses Dehydropeptid zerfällt bereits bei milder Hydrolyse und führt zum Bruch der Peptidkette:



Solche o.a. Proteinradikale können aber auch miteinander reagieren unter Ausbildung intra- und intermolekularer kovalenter C-C-Bindungen (50).

Als mögliche Folgereaktionen derartiger Enzymradikale werden also intra- und intermolekulare Quervernetzungen, Bruch infolge von Disproportionierung und, nach Hayden et al. (46) besonders bei globulären Proteinen eine reparative Vereinigung diskutiert. (Diese Wiederherstellung kann dabei sowohl an der eigentlichen Bruchstelle als auch an unspezifischer Stelle geschehen). Eine Disproportionierungsreaktion, die einen Bruch der Peptidkette verursacht, kann zur Abnahme des Molekulargewichts des Enzyms und zum Auftreten kleinerer Protein- oder Peptidbruchstücke führen.

Andererseits kann es auf Grund von strahleninduzierten Radikalreaktionen auch zur Ausbildung neuer kovalenter Bindungen kommen. Handelt es sich dabei um intramolekulare Bindungen, so bleibt das ursprüngliche Molekulargewicht erhalten, auch wenn die Peptidkette durch die Radiolyse gebrochen ist. Sind diese neugebildeten Bindungen Disulfidbrücken, so lassen sie sich reduzieren und man erhält, falls bei der Radiolyse auch Disproportionierungsreaktionen abliefen, Proteinbruchstücke. Die so neu gebildeten C-C-Bindungen lassen sich nicht wieder spezifisch

spalten. Intramolekulare Bindungen dieser Art verhindern natürlich auch die vollständige Entfaltung des Proteinmoleküls bei der Inkubation mit SDS, wie es Peuten nach Bestrahlung von LDH unter N_2 zeigen konnte.

Entstehen durch die Radiolyse hingegen intermolekulare kovalente Bindungen, so kommt es zu einer Vergrößerung des ursprünglichen Molekulargewichts. Wie in dieser Arbeit aber gezeigt wurde, waren bis zu einer Dosis von 96 krd mit Hilfe der Gelfiltration keine vergrößerten Proteinmoleküle feststellbar, sodaß die Ausbildung solcher Bindungen zwischen den ursprünglichen Proteinmolekülen für die hier beschriebenen Bindungen keine Rolle spielt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß derartige intermolekulare kovalente Bindungen auch zwischen Peptidbruchstücken und Protein entstehen. In einem solchen Fall ist die Auffindung der Bruchstücke nach unserem Verfahren nur dann möglich, wenn es sich dabei um reduzierbare S-S-Brücken handelt.

Niemczyk und Peuten, die LDH unter N_2 mit hohen Dosen bestrahlten, hatten Bruchstücke mit Molekulargewichten von 15 000, 8500 und 500 resp. 1000 gefunden:

Niemczyk konnte in seiner Arbeit zeigen, daß das Aggregat, das beim Bestrahlen von LDH unter N_2 entstand, aus Proteinbruchstücken besteht, die über hydrophobe Bindungen und elektrostatische Wechselwirkungen zusammen-

gehalten werden. Intermolekulare Disulfidbrücken waren in diesem Fall nicht nachweisbar.

Peuten hingegen, der strahleninaktivierte LDH untersuchte, die nicht aggregiert war, konnte Peptidbruchstücke erst nachweisen, wenn die durch Radiolyse gebildeten Disulfidbrücken reduziert worden waren. In beiden Fällen hatte sich also gezeigt, daß bei Bestrahlung unter N_2 die Peptidkette der LDH radiolytisch gespalten wird, wobei die Molekulargewichte der gefundenen Bruchstücke im Bereich zwischen 500 und 15 000 liegen.

In der Hoffnung eventuell auch unter den von uns aufgestellten Versuchsbedingungen ähnliche, kleine Bruchstücke zu finden, hatten wir die Lösung zunächst über Sephadex G-10 aufgetrennt. Betrachtet man die von diesen Versuchen aufgenommenen Chromatogramme insgesamt, läßt sich jedoch kein Hinweis auf derartige kleine Bruchstücke finden.

Dies kann möglicherweise an der bereits erwähnten Reduktion bei niedrigem pH-Wert liegen, bei der die Reduktion nicht vollständig abläuft. Zwar wurden die mit niedrigen Dosen bestrahlten Enzymproben unter Einwirkung von SDS verzögert von Sephadex G-10 eluiert. Da dies aber auch bei unbestrahlter LDH der Fall war, kann man nicht annehmen, daß es sich um Moleküle mit einem Molekulargewicht unterhalb von 45 000 handelt. Eine plausible Erklärung für die Verzögerung der Enzymproben wäre, daß es sich um eine Wechselwirkung des Gels mit dem SDS-Proteinkomplex handelt. Wieso eigentlich überhaupt eine Wechsel-

wirkung zwischen dem in H_2O gequollenen Gel und dem Protein zustande kommt, ist noch völlig ungeklärt. Dennoch scheint es für ein derartiges Geschehen, wie es auch in der Literatur beschrieben wird (51), vielfältige Reaktionsmöglichkeiten zu geben.

In Erwägung zu ziehen wären z.B. kurzzeitige Metallkomplexbildungen zwischen den im Gel enthaltenen Metallkationen und den nach außen gerichteten SO_4^{--} -Anionen der SDS/LDH-Moleküle.

Eventuell könnte auch eine durch Enzymradikalreaktion entstandene Quervernetzung eine sterische Verzögerung des Eluats verursacht haben; möglich wäre ebenso eine Verzögerung auf Grund von Reibung. Elektrostatische Bindung terminaler Carboxylgruppen des Gels mit NH_2 -Gruppen des Proteins (52) dagegen, oder auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Gel und aromatischen Proteinseitenketten, bei denen sich zwischen den Π -Elektronen der aromatischen Gruppen und den Π -Elektronen des Gels Adsorptionsvorgänge abspielen (53, 54), sollten auf Grund der zugesetzten SDS-Menge von 1,4 g/g eigentlich keine Rolle spielen dürfen. Denkbar wären weiterhin auch Wechselwirkungen der SH-Gruppen mit der Gelmatrix. Diese Reaktionen würden dann mit zunehmender Strahlendosis auf Grund der Entstehung von S-S-Bindungen immer geringfügiger. Das entspräche gut dem mit steigender Dosis sich kontinuierlich V_0 annähernden Elutionszeitpunkt.

Im Widerspruch dazu steht allerdings das Trennergebnis nativer LDH mit Zusatz von 1,8 g SDS/g LDH. Eine Erklärung dieser Tatsache könnte allenfalls darin zu finden sein, daß Trennungen über dieses Gel einer äußerst großen Schwanungsbreite (in unserem Fall 8 (!) Fraktionen) unterliegen. Bereits andere Autoren (14, 23) wiesen auf ähnliche Schwierigkeiten bei Chromatographien über engvernetzte Gele (G-10 und G-25) hin. So erhielt z.B. Niemczyk, der für die Aminosäurenanalyse Proteinbruchstücke von LDH über G-25 fraktionierte, mehr oder minder anormale Elutionsvolumina: In einem Fall wurde ein Proteinbruchstück erst nach dem Natriumphosphat eluiert, ein anderes LDH-Bruchstück mit einem Molekulargewicht von ~ 500 kam im V_0 zur Elution.

Bei Peuten, der nach Bestrahlung ein Bruchstück der Grösse 1000 fand, wurde dieses hingegen auf G-10 verzögert eluiert. Da diese beiden Autoren allerdings kein SDS mitverwendeten, hätten bei ihnen sehr wohl elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen ablaufen können.

Zusammenfassend muß jedoch gesagt werden, daß eine eindeutige Erklärung der überraschenden Trennergebnisse von G-10 nicht im Rahmen der dieser Arbeit Möglichen liegt.

Bei der Gelfiltration über G-75 können globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von über 70 000 nicht mehr in die Gelmatrix eindringen, während für entfaltete Proteine die Ausschußgrenze oberhalb von 15 000 liegt. So hätte die Zerstörung des nach entsprechender Behandlung entstan-

denen Monomeren an nur einer Stelle in den meisten Fällen genügt, um eine Verzögerung bei der Elution zu erreichen. Nur bei einem Bruch, der 2 gleichgroße Stücke erzeugt hätte, wäre eine Elution im Ausschlußvolumen möglich. Daß Bruchstücke auch bei Gelfiltration über G-75 nicht eigenständig zur Elution kamen, mag wieder an der nur im sauren Milieu und damit nicht vollständig abgelaufenen Reduktion liegen.

Die Schwierigkeit beim Nachweis der entstandenen Proteinbruchstücke mittels Gelfiltration lag darin, daß sie auf G-10 zusammen mit dem Protein im V_0 eluiert werden, das sich in der Größe nicht von nativer LDH unterscheidet. Ohne Reduktion des bestrahlten Enzyms war auch nach Chromatographie über G-75 oder S-200 kein Proteinbruchstück nachweisbar. Reduzierten wir die Lösung vorher mit Mercaptoäthanol, wurden die so erhaltenen Bruchstücke zwar zusammen mit dem Reduktionsmittel von der S-200-Säule eluiert, konnte aber wegen des großen Überschußes an Mercaptoäthanol weder spektralphotometrisch noch kolorimetrisch nachgewiesen werden. Erst durch eine anschließende Chromatographie der Fraktionen, die sowohl Mercaptoäthanol als auch Protein enthielten, über G-10 konnten beide Substanzen getrennt werden. Dabei kamen die Peptide in Fraktion 33 ($V_0 = 27$) zur Elution, während das Mercaptoäthanol auf diesem Gel stark verzögert eluiert wurde (Fraktion 75). Da einerseits Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 5000 auf S-200 nicht getrennt werden

und andererseits die Ausschlußgrenze von G-10 bei einem Molekulargewicht von 700 liegt, müssen die durch Radiolyse entstandenen Peptide ein Molekulargewicht zwischen 700 und 5000 haben. Wegen der bereits genannten Wechselwirkungen von G-10 mit dem Enzym ist jedoch eine genaue Gewichtsabschätzung nicht möglich. Die entstandenen Proteinstücke könnten nämlich auf dieser Säule z.B. auch eine für ihre Größe zu frühe Elution erfahren haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch Bestrahlung einer N_2O -gesättigten Enzymlösung mit etwa 100 krd Peptidkettenbrüche entstehen, die wahrscheinlich durch $OH^\bullet$ -Radikale verursacht worden sind. Die Abnahme der Proteinmenge korrelativ zur Größe des LDH-Moleküls war allerdings bei dieser Dosis kaum nachweisbar; der Mengenanteil der abgespaltenen Peptide blieb recht gering. Eine mögliche Erklärung dieser Tatsache wäre, daß $OH^\bullet$ -Radikale Peptidbrüche nur in geringerem Ausmaß als hydratisierte Elektronen bewirken. Andererseits ist es aber auch möglich, daß strahleninduzierte Peptidbrüche durch gleichzeitig entstandene kovalente Bindungen maskiert werden. Zu einem geringen Teil handelt es sich dabei um S-S-Brücken, denn nur nach ihrer Reduktion ist überhaupt erst der Nachweis von Peptidbrüchen möglich, während ohne Reduktion keine Peptide auffindbar waren. Unter Einwirkung von $OH^\bullet$ -Radikalen können weiterhin als kovalente Bindungen intra- oder intermolekulare C-C-Bindungen entstehen, wo-

durch ebenfalls vorhandene Peptidkettenbrüche nicht auffindbar werden. Welcher Mechanismus bedingt, daß bei Radiolyse von LDH unter N_2O nur in sehr geringem Ausmaße Peptidbrüche nachweisbar sind, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5. Zusammenfassung

LDH-M₄ wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, gelöst und unter N₂O einer Röntgenbestrahlung mit Dosen von 33 - 96 krd ausgesetzt. Die Enzymkonzentration betrug stets 1 mg/ml.

Zu Beginn der Arbeit wurden einige Proben nach der Bestrahlung über das neue LKB-Gel AcA-34 chromatographiert. Diese Versuche lieferten den Beweis, daß bis zu einer Dosis von 96 krd unter N₂O unter den festgelegten Arbeitsbedingungen kein Aggregat entstand. Alle weiteren bestrahlten Lösungen wurden mittels Gelfiltration über Sephadex G-75 in 0,01 M Natriumphosphatpuffer überführt und mit Natriumdodecylsulfat im Verhältnis 1,4 : 1 versetzt. Einen Teil dieser Protein/SDS-Lösungen inkubierten wir anschließend mit 1%igem Mercaptoäthanol, sowohl bei saurem als auch bei basischem pH. Im weiteren Verlauf wurden diese sowie die nicht reduzierten Proben über G-10, G-75 und S-200 aufgetrennt.

Dabei ließen die Chromatogramme der nativen und der nicht reduzierten, bis einschließlich 57 krd bestrahlten LDH-Lösungen, die über G-10 gelfiltriert worden waren auf starke Wechselwirkungen des Proteins mit der hochpolymeren Gelmatrix schließen: sämtliche Proben kamen verzögert zur Elution, obwohl sie im Ausschlußvolumen hätten eluiert werden müssen. Ausnahmen bildeten eine mit 66 krd bestrahlte, nicht reduzierte Lösung, eine mit gleicher

Dosis bestrahlte, aber reduzierte Probe sowie die Enzymlösung nativer LDH mit Zusatz von 1,8 g SDS/g Protein: Alle 3 Lösungen hatten ihr Elutionsmaximum im Ausschlußvolumen.

Wurde unterschiedlich stark bestrahlte LDH (versetzt mit der jeweils entsprechenden Menge SDS) über Sephadex G-75 aufgetrennt, stimmte ihr Elutionsvolumen mit dem Ausschlußvolumen überein, unabhängig davon, ob sie mit Mercaptoäthanol inkubiert worden war oder nicht. Da auch bei diesen Versuchen die Reduktion nur unvollständig abgelaufen war, konnten nicht alle intra- und intermolekularen S-S-Bindungen gespalten werden. Dies hatte zur Folge, daß sich das Molekül zwar hinsichtlich seiner räumlichen Struktur veränderte, nicht aber Peptidbrüche gefunden werden konnten. Ein derartiger Nachweis ließ sich erst nach Trennung einer mit 96 krd bestrahlten, bei pH 8,6 reduzierten Proteinklösung über das ebenfalls neue Gel Sephacryl 200 erbringen. Dabei wurden die abgespaltenen Peptide zunächst mit dem Reduktions- bzw. Alkylierungsmittel in einem 2ten Peak gemeinsam eluiert. Mit der Chromatographie dieses Peak über Sephadex G-10 konnten beide Substanzen dann voneinander getrennt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß nach Bestrahlung unter N_2O Peptidbrüche nur in sehr geringem Umfang und auch dann nur nach Reduktion nachweisbar sind. Man kann daher annehmen, daß durch $OH^{\bullet}$ Radikale vorwiegend andere Reaktionen als die von Garrison angegebene Disproportionierung bedingt werden z.B. die Bildung neuer kovalenter Bindungen.

6. Literaturverzeichnis

1. E. Buddecke : Grundriß d. Biochemie, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 462 (1973)
2. Jaenicke, R.
Knof. S. : European J. Biochem. 4, 157 (1968)
3. Jaenicke, R. : Biochim. Biophys. Acta 85, 186 (1964)
4. Di Sabato, G.
Pesce, A.
Kaplan, N.O. : Biochim. Biophys. Acta 77, 135 (1963)
5. Adams, M.J.,
Ford, G.C. et al.: Nature 227, 1089 (1970)
6. Haber F.
Weiss, J. : Proc. Roy. Soc. London 17, 147, 332 (1934)
7. Hart, E.J.
Boag, J.W. : J. Amer. chem. Soc. 84, 4090 (1962)
8. Keene, J.P. : Nature, London 197, 47 (1963)
9. Denkl, C.P. : Dissertation Erlangen (1971)
10. Kunigk, K. : Dissertation Erlangen (1973)
11. Haskill, J.S.,
Hunt, J.W. : Radiat. Res. 32, 827 (1967)
12. Shapira, R. : Int. J. Radiat. Biol. 7, 537 (1963)
13. Jung, H.,
Schüßler, H. : Z. Naturforschung 21 b, 224 (1966)
14. Niemczyk, P. : Dissertation Erlangen (1974)
15. Zahn, H.T. : Dissertation Erlangen (1976)
16. Warburg, O.,
Christian, W.: Biochim. Z. 286, 81 (1936)
17. Bergmeyer, H.N.: "Methoden der enzymat. Analyse" Bd. I,
Weinheim/Bergstraße (1970)
18. Fricke, H.,
Petersen, B.W.: Strahlentherapie 26, 329 - 346 (1927)
19. Dertinger, H.,
Jung, H. : "Molekulare Strahlenbiologie" Springer
Verlag Berlin-Heidelber-New York (1969)

20. Matheson, M.S.,
Dorfmann, L.M.: "Pulse Radiolysis" M.J.T. Press,
Cambridge (1969)
21. Tabellen für Ge-
schwindigkeits-
konstanten : erstellt vom National Bureau of Stan-
dards NSRDS - NBS 43/46 (1973)
22. Nelson, C.A. : J. biol. Chem. 246, 3895 (1971)
23. Peuten, P.M. : Dissertation Erlangen (1976)
24. Jaenicke, R.,
Pfleiderer, G.: Biochim. Biophys. Acta 60, 615 (1962)
25. Alexander P.,
L.D.G.Hamilton: Rad. Res. 13, 214 (1960)
26. Jaenicke, R. : Private Mitteilungen, noch nicht ver-
öffentlicht.
27. Eichhorn, M. : Dissertation Erlangen (1973)
28. Reynolds, J.A.,
Tanford, C. : Proceedings of the National Academy
of Sciences 66, 1002 (1970)
29. Di Sabato, G.,
Kaplan, N.O. : J. biol. Chem. 239, 438 (1964)
30. Reynolds, J.A.,
Tanford, C. : J. biol. Chem. 245, 5161 (1970)
31. Buchanan, J.D.,
Armstrong, D.A.: Int. J. Radiat. Biol. 30, 115 (1976)
32. Delincée, H.,
Radola, B.J. : Rad. and Environm. Biophys. 11, 213 -
218, Springer Verlag (1974)
33. Lynn, K.R. : Radiat. Res. 51, 255 - 264 (1972)
34. Schüßler, H. : Biophys. 9, 315 - 324 (1973)
35. Adams, G.F.,
Willson, R.L.,
Bisby, R.H.,
Candall, R.B. : Int. J. Radiat. Biol. 20, 405 - 415
(1971)
36. Jung, H.,
Schüßler, H. : Stud. biophys. 7, 23 (1968)
37. Brustard, T. : Radiat. Res. 27, 456 (1966)

38. Badiello, R.,
Tamba, M.,
Quintiliani, M.: Int. J. Radiat. Biol. 26, 311 - 319
(1974)
39. Offinger, R.M.: Dissertation Erlangen (1976)
40. Schüßler, H. : Int. J. Radiat. Biol. 27, 171 - 180
(1975)
41. Sanner, T.,
Pihl, A. : Biochim. biophys. Acta 146, 146, 298
(1967)
42. Fish, W.W.,
Reynolds, J.A.,
Tanford, C. : J. biol. Chem. 245, 5166 (1970)
43. Pitt - Rivers, R.,
Impiombato, E.S.A.: Biochem. J. 109, 825 (1968)
44. Rogers, K.S.,
Yasko, S.C. : J. Biol. Chem. 244, 6690 (1969)
45. Weber, K.,
Osborn, M. : J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
46. Hayden, G.A.,
Rogers, S.C.,
Friedberg, F. : Arch. Biochem. Biophys. 113, 247
(1966)
47. Means, E.G.,
Reeny, E.R. : Chem. Med. of Proteins 149, (1971)
48. Rodgers, M.A.I.,
Sokol, H.A.,
Garrison, W.M.: J. Amer. Chem. Soc., 90, 795 (1968)
49. Garrison, M.W.,
Weeks, B.M. : Radiat. Res. 17, 341 (1962)
50. Lichtin, N.N.,
Ogdan, J.,
Stein, F. : Biochim. Biophys. Acta 276, 124 (1972)
51. Determann, H.,
Walter, J. : Nature, 219, 604 (1967)
52. Informations-
schrift : "Sephadex - Gelfiltration in Theorie
und Praxis", Pharmacia Uppsala (1969)

- 53. Ziska, P. : J. Chromatogr. 60, 139 (1971)
- 54. Streffer, C. : "Strahlen-Biochemie" Springer Verlag (1969)
- 55. Richterich, R: Klinische Chemie "Theorie und Praxis" 305, (1971)
- 56. Geiger, P.J.,
Bessman S.P. : Anal. Biochem. 49, 467 (1972)

Herrn Prof. Dr. Dr. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung von seiten des Instituts.

Frau Priv. Doz. Dr. H. Schüßler bin ich besonders dankbar für ihre wissenschaftliche Anleitung, ihre stete Hilfsbereitschaft und praktische Unterstützung. Frau Dr. H. Schüßler hat mit ihrem persönlichen Einsatz ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ferner möchte ich an dieser Stelle Frl. A. Herget danken, deren freundlicher Hilfe ich stets sicher war.

Lebenslauf

Am 29.11.1951 wurde ich in Würzburg/Unterfranken als Tochter des Dipl.-Ing. Architekten Walter Proksch und seiner Ehefrau Gerda Proksch, geb. Ditthardt, geboren. 1955 übersiedelte die Familie nach Bayreuth/Oberfranken, wo ich von 1958 bis 1963 die Volksschule besuchte. Im September 1963 trat ich in das Richard-Wagner-Gymnasium ein und legte dort im Juni 1972 das Abitur ab. Im WS 1972/73 begann ich das Studium der Chemie an der Justus-Liebig-Universität Gießen; im SS 1973 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen das Studium der Humanmedizin. Nach 4 Semestern legte ich dort das Physikum, nach weiteren 2 Semestern das 1. Staatsexamen ab. Im SS 1977 wechselte ich an die Freie Universität Berlin über, wo ich im März 1978 das 2. Staatsexamen ablegte. Von April 1978 bis April 1979 absolvierte ich dort das Praktische Jahr und beschloß das Studium im Mai 1979 mit dem 3. Staatsexamen.

